
**BIOLOGIA
CELULAR**

BIOLOGÍA CELULAR

BIOLOGÍA CELULAR

E. D. P. DE ROBERTIS

*Director del Instituto de Anatomía General y
Embriología, Facultad de Medicina,
Buenos Aires, Argentina*

*Profesor Titular de la Primera Cátedra de
Histología y Embriología, Facultad de
Medicina. Buenos Aires, Argentina*

W. W. NOWINSKI

*Profesor de la Universidad de Texas,
Galveston. Texas*

F. A. SÁEZ

*Director del Departamento de Citogenética,
Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas,
Montevideo. Uruguay*

OCTAVA EDICIÓN



LIBRERÍA "EL ATENEO" EDITORIAL
BUENOS AIRES - LIMA - RIO DE JANEIRO - CARACAS
MONTEVIDEO - MEXICO - BARCELONA

1946 *Primera edición en castellano*
1948 *Primera edición en inglés*
1952 *Segunda edición en castellano*
1954 *Segunda edición en inglés*
1955 *Tercera edición en castellano*
1956 *Primera edición en japonés*
1958 *Segunda edición en japonés*
1960 *Cuarta edición en castellano*
1960 *Tercera edición en inglés*
1962 *Primera edición en ruso*
1963 *Quinta edición en castellano*
1965 *Sexta edición en castellano*
1965 *Cuarta edición en inglés*
1966 *Primera edición en italiano*
1968 *Séptima edición en castellano*
1969 *Primera edición en polaco*
1969 *Primera edición en húngaro*
1970 *Octava edición en castellano*

I M P R E S O E N L A A R G E N T I N A

Queda hecho el depósito que previene la ley. © 1970. "El Ateneo" Pedro García S. A.
Librería, Editorial e Inmobiliaria, Florida 340 - Buenos Aires.

Este libro se terminó de imprimir el 25 de junio de 1970 en los Talleres Gráficos Rodríguez Hnos. & Cía., Tte. Ranguní 2882, Lanús Oeste.

PR EFACIO

Del prefacio de la primera edición de *Citología general*, publicada en 1946, transcribimos los conceptos siguientes: “Este libro surgió inicialmente de la necesidad de tener en castellano una síntesis de los aspectos más importantes de la citología moderna”. “Esta rama de la biología ha experimentado en los últimos años un rápido progreso y se ha convertido en la base fundamental del estudio de la estructura y función de los seres vivos, tanto en el estado normal como patológico. La célula puede ser considerada como la unidad vital de los organismos y, como tal, el substrato anatómico y fisiológico de los fenómenos biológicos. En su aspecto morfológico, la citología moderna ha ido más allá de la simple descripción de las estructuras visibles con el microscopio; mediante la aplicación de nuevos métodos ha comenzado el análisis de la organización submicroscópica —la arquitectura de las moléculas y micelas que componen la materia viviente—. En su aspecto funcional ha superado la etapa puramente descriptiva de los cambios fisiológicos y busca su razón de ser en la intimidad de los procesos fisicoquímicos y metabólicos del protoplasma. Por fin, la moderna citología, sobre la base de las estructuras nucleares, ha tratado de interpretar y explicar los fenómenos de herencia, sexo, variación, mutación y evolución de los organismos vivos.”

A través de los cinco lustros transcurridos, estos postulados han sido siempre válidos, pero fue tan rápido y revolucionario el progreso, que nos ha obligado a hacer revisiones extensas en cada edición, y en las dos últimas, a re-dactarlo totalmente.

El título de BIOLOGÍA CELULAR, adoptado desde entonces, no sólo se justifica por los profundos cambios introducidos en el libro, sino por destacar a la célula como una unidad central en la biología contemporánea. Mientras que en los últimos años hemos sido espectadores del extraordinario desarrollo de la biología molecular, que ha demostrado el papel fundamental de moléculas complejas como las proteínas y los ácidos nucleicos, es evidente que estos avances deberán integrarse dentro del andamiaje de la célula, como la verdadera organización estructural y funcional de la materia viviente.

En este libro, la célula será analizada en todos los niveles de organización, empleando los diversos instrumentos ópticos (por ejemplo, microscopios óptico y electrónico, difracción de rayos X) capaces de revelar su organización subcelular, macromolecular y molecular. Al mismo tiempo será estudiada citoquímicamente en su composición química y su metabolismo, y funcionalmente por el análisis de las manifestaciones celulares más importantes, tales como: contractilidad, excitabilidad, permeabilidad, nutrición y secreción. Se destacará esta integración en el estudio de las macromoléculas que contienen

información biológica, los cromosomas, la división celular y las bases citológicas y moleculares de la genética.

Este libro está destinado principalmente a los estudiantes universitarios y preuniversitarios de Medicina, Bioquímica, Agronomía y Veterinaria, ciencias naturales, biológicas y genéticas, pero también a aquellos profesionales biólogos, médicos, patólogos, agrónomos, veterinarios, bioquímicos, etcétera, que por necesidad de docencia, investigación o de cultura biológica general desean tener un panorama amplio de la moderna citología.

Se ha organizado el contenido del libro, para hacerlo más útil al estudiante, de manera que vaya de los temas más simples a los más complejos. Así, al comienzo del libro se incluyen capítulos que repasan la química de la célula, las enzimas y el metabolismo. También el análisis de las estructuras macromoleculares y de los modelos de membranas inicia el estudio de los aspectos estructurales de la célula. Con el objeto de mantener al libro dentro de límites razonables se ha incorporado el nuevo material a expensas de otros más antiguos y no tan esenciales. Muchas de las figuras son nuevas, y se han agregado numerosas tablas y diagramas que sirven para resumir y explicar gráficamente los nuevos conocimientos.

El material está ahora dividido en ocho partes y en 25 capítulos, en vez de los 23 de la última edición. Cada parte es precedida por una introducción especial que se refiere a su contenido. Sus títulos son: Introducción a la biología celular, Componentes moleculares y metabolismo de la célula, Métodos de estudio de la célula, Unidades de estructura y la membrana celular, El citoplasma y los organoides citoplasmáticos, Las bases celulares de la citogenética, Biología molecular y Fisiología celular. Los cambios más marcados se han producido en los capítulos sobre: La membrana plasmática, El citoplasma, Las mitocondrias, y aquellos que ahora se incluyen en la parte de Biología molecular. Aquí el capítulo 16 sobre Ultraestructura del nucléolo es completamente nuevo y también lo son, en gran parte, los otros cinco capítulos que la integran. Hay cambios importantes, asimismo, en los cinco capítulos que ahora comprenden la Fisiología celular.

A causa de la naturaleza del presente libro sólo se da una breve bibliografía al final de cada capítulo, y ésta se divide en *Bibliografía general*, referente a libros, o artículos de revisión que se pueden usar como lecturas suplementarias o como guía para la literatura más específica. No se ha tratado de abarcar extensamente la literatura, y la *Bibliografía citada* se menciona por números en el texto.

Estamos agradecidos a numerosos colegas por haber colaborado en el mejoramiento de esta edición. Queremos destacar la ayuda prestada por los profesores H. M. Gerschenfeld, A. Lasansky, A. Pellegrino de Iraldi, C. Tandler, J. A. Zadunaisky y D. Zambrano. El Dr. F. J. Barrantes contribuyó muy eficazmente en la coordinación general de esta edición.

Deseamos expresar muy especialmente nuestro agradecimiento a los numerosos colegas de todo el mundo que han contribuido a enriquecer el valor de este libro con tablas, figuras o sugerencias.

En la preparación del original y de las ilustraciones intervinieron muy eficazmente las señoras Julia Elena C. de Núñez, Alicia F. de Candame, Susana M. de Narepki, Lina L. de Stein y Alba M. de Novara.

Agradecemos a la *Editorial "El Ateneo"*, y muy especialmente a la señora Dolly de Anguiano, la esmerada presentación de esta obra.

Nos ha alentado, además, en nuestra labor la cálida recepción que ha tenido este libro en sus ediciones en inglés, japonés, ruso, italiano, húngaro y polaco. Hemos recibido numerosas sugerencias de colegas, profesores y estu-

diantes de muchos países. No podemos enumerarlas aquí, pero todas han contribuido a mejorar esta edición. Estamos especialmente agradecidos a los profesores George E. Palade, Elof Carlson, Bernard Strauss y Lewis J. Kleinsmith por haber leído críticamente las últimas ediciones inglesas y por sus sugerencias para mejorar la presente.

Una obra que trata de interpretar y traducir en términos didácticos los últimos adelantos de la moderna biología celular sólo es posible con la colaboración desinteresada de todos los que han contribuido al progreso permanente de este campo del conocimiento.

E. DE ROBERTIS
W. W. NOWINSKI
F. A. SÁEZ

ÍNDICE

PRIMERA PARTE

INTRODUCCION A LA BIOLOGIA CELULAR

1. Introducción. Historia y conceptos sobre biología celular	2
Niveles de organización en biología	2
Límites y dimensiones en biología	3
Historia de la citología	8
Estado actual de la biología	9
Fuentes bibliográficas en biología	11
2. Estructura general de la célula	13
Forma y tamaño	13
La célula viviente	14
La célula fijada	16
3. Introducción general al estudio del núcleo y de los cromosomas	21
Núcleo	21
Cromosomas	25

SEGUNDA PARTE

COMPONENTES MOLECULARES Y METABOLISMO DE LA CELULA

4. Componentes químicos de la célula	38
Población molecular de la célula	38
5. Enzimas y metabolismo celular y bioenergética	57
Enzimas	57
Metabolismo celular	63
Bioenergética	66

TERCERA PARTE

METODOS DE ESTUDIO DE LA CELULA

6. Instrumentos de análisis de las estructuras biológicas	74
Métodos para aumentar el contraste de fase	74

7. Métodos para el análisis citológico y citoquímico	89
Examen vital	89
Fijación	90
Inclusión y corte	93
Coloraciones citológicas	93
Histoquímica y citoquímica	95

CUARTA PARTE

BASES ESTRUCTURALES DE LA CELULA

8. Unidades elementales de estructura en los sistemas biológicos	118
Funciones de las estructuras elementales	118
Estructuras membranosas elementales	122
9. La membrana celular	128
Estructura molecular de la membrana plasmática	130
Cubiertas externas de la membrana celular	142

QUINTA PARTE

EL CITOPLASMA Y LOS ORGANOIDES CITOPLASMICOS

10. El citoplasma	148
Matriz citoplásmica	148
Sistema vacuolar	153
11. Mitocondrias. Estructura y función	172
Observación en células vivientes	172
Morfología	173
Estructura mitocondrial	175
Funciones mitocondriales	182
La mitocondria como organoide semiautónomo	192
Biogénesis mitocondrial	195
12. La célula vegetal. Cloroplasto: estructura y función	198
Plástidos: cloroplastos	205

SEXTA PARTE

BASES CELULARES DE LA CITOGENETICA

13. División celular: mitosis y meiosis	221
Mitosis	221
Meiosis	235
14. Bases cromosómicas de la genética	245
Leyes de la herencia	245
Ligamiento y crossing-over	249
Alteración de los cromosomas y mecanismos de su organización	253
Variación en el número de cromosomas	257

Efecto genético de las radiaciones	260
Acción citogenética de los agentes químicos	264
Citogenética y evolución	265
15. Determinación del sexo y citogenética humana	268
Determinación del sexo	268
Herencia ligada al sexo	273
Citogenética humana	275

SÉPTIMA PARTE

BIOLOGIA MOLECULAR

16. Ultraestructura del núcleo y de los cromosomas. El nucléolo	285
Envoltura nuclear y permeabilidad del núcleo	285
Ultraestructura del núcleo interfásico	287
Estudios de la estructura cromosómica	292
El nucléolo	297
17. Citoquímica del núcleo. Duplicación del ácido desoxirribonucleico ..	301
Estudio citoquímico del núcleo	301
18. Ribosomas. Estructura y biogénesis	320
Ribosomas	320
Biogénesis en células eucariontes	326
19. Síntesis proteica y genética molecular	335
Expresiones moleculares de la acción genética	335
Genes y síntesis proteica	338
Ultraestructura de los genes	351
Regulación de la acción del gene	353
20. Diferenciación celular e interacción celular	357
Diferenciación celular	357
Interacción celular	367

OCTAVA PARTE

FISIOLOGIA CELULAR

21. Permeabilidad celular, fagocitosis, pinocitosis y lisosomas	375
Permeabilidad celular	375
Endocitosis	383
Lisosomas	388
Microcuerpos	395
22. Cilios, centriolos, microtúbulos y movimiento ameboide	397
Cilios y movimientos ciliares	397
Microtúbulos	407
Movimiento ameboide	410
23. Biología molecular del músculo	415
Miofibrillas	416
Contracción muscular	423

24. Bases celulares de la conducción nerviosa y de la transmisión sináptica	428
Trasmisión sináptica	439
25. Biología celular de la secreción	453
Ciclo secretor	454
Indice Alfabético	469

PRIMERA PARTE

INTRODUCCION A LA BIOLOGIA CELULAR

Los tres primeros capítulos del libro constituyen una introducción elemental al estudio de la célula como unidad biológica. La materia viviente se presenta como la resultante de una combinación de niveles de organización, de cuya integración proceden las manifestaciones vitales de los organismos. Desde el punto de vista morfológico, los niveles de organización están relacionados con las dimensiones que pueden discernir los distintos medios de observación; sean éstos: el ojo humano (Anatomía), los diversos tipos de microscopios (Histología, Citología) y otros métodos que permiten ahondar en la ultraestructura de la célula y la Biología molecular. Se destaca la división de los organismos en procariotes y eucariontes, describiéndose como ejemplo de los primeros una bacteria, la *Escherichia coli*, que es sin duda la mejor conocida desde el punto de vista molecular y genético. Es importante que el lector reconozca desde el comienzo las semejanzas y las diferencias que existen entre estos dos tipos de organismos, tema sobre el cual se insistirá en muchos capítulos posteriores. La necesidad de una masa mínima vital es una consecuencia de estos estudios.

En el capítulo 1 se hace también un rápido análisis de la Historia de la Citología, destacándose el establecimiento de la Teoría celular y la correlación de aquella ciencia con la Genética, la Fisiología celular y la Bioquímica, así como los modernos aspectos de la Ultraestructura y de la Biología molecular.

El capítulo 2 se refiere a la estructura general de la célula, tanto en estado viviente como después de la fijación. Se mencionan asimismo los principales componentes del núcleo y del citoplasma, que serán estudiados en detalle más adelante. En el capítulo 3 se inicia el estudio del ciclo vital de la célula, que está vinculado directamente con los procesos de división mitótica y meiótica, y con el concepto de la continuidad de los cromosomas como entidades susceptibles de autoduplicarse y de mantener su morfología y función a través de divisiones sucesivas. Se incluye aquí el estudio de las constantes morfológicas del cromosoma, como el número, forma, tamaño, presencia de constricciones primarias y secundarias, satélites, etcétera, que en conjunto caracterizan al cariotipo de una especie. Este capítulo se halla en relación directa con la quinta parte del libro, que estudia las Bases celulares de la Citogenética. Sin embargo, es conveniente que desde el principio el lector se ponga en contacto con estos conceptos fundamentales, y ello explica su colocación al comienzo de la obra.

1

Introducción

Historia y conceptos sobre Biología celular

Los antiguos filósofos y naturalistas, en especial Aristóteles en la Antigüedad y Paracelso en el Renacimiento, llegaron a la conclusión de que “todos los animales y vegetales, por más complicados que sean, están constituidos por unos pocos elementos que se repiten en cada uno de ellos”. Se referían a las estructuras macroscópicas de un organismo, como las raíces, hojas y flores comunes a diferentes vegetales o a los segmentos u órganos que se repiten en el reino animal. Muchos siglos más tarde, merced al invento de las lentes de aumento, se descubrió que detrás de esa estructura macroscópica existe todo un mundo de dimensiones microscópicas. También se encontró que una sola célula aislada puede constituir un organismo entero, como en el caso de los Protozoarios, o bien agruparse y diferenciarse en tejidos y órganos, formando un organismo multicelular.

Por tanto, la *célula* es una unidad morfológica y fisiológica en la estructura de los seres vivos, así como el átomo lo es en la estructura química. Se la puede considerar como un organismo en sí misma, a menudo muy especializado y compuesto por muchos elementos, la suma de los cuales no sólo constituye la unidad celular, sino que tiene un significado particular en el organismo considerado en su totalidad. Si por medios mecánicos o de otra naturaleza se destruye la organización celular, la función de la célula también se altera; y aunque puedan persistir algunas de las propiedades vitales (por ejemplo, la actividad de algunas enzimas), pierde su significado como unidad organizada y muere.

El desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas microscópicas permitieron obtener un

mejor conocimiento de la estructura celular, no sólo como aparece en una célula muerta por fijación, sino también como se la ve en estado viviente. Los estudios bioquímicos, por otro lado, demostraron que los productos de la materia viviente, y aun esta misma, están compuestos por los propios elementos que constituyen el mundo inorgánico. Los bioquímicos aislaron de mezclas complejas de constituyentes celulares, además de componentes inorgánicos, moléculas mucho más complejas como proteínas, grasas, polisacáridos, ácidos nucleicos y otros.

NIVELES DE ORGANIZACIÓN EN BIOLOGÍA

El avance del conocimiento respecto de la composición de la célula, en particular el que resulta de la aplicación de modernos métodos físicos de investigación, como la polarización óptica, difracción de rayos X y microscopía electrónica, está produciendo un cambio fundamental en la interpretación de las estructuras celulares. Así, se ha demostrado que más allá de la organización visible con el microscopio óptico, existe un número de estructuras más elementales en el nivel macromolecular que constituyen la “ultraestructura” de la célula. Nos encontramos en la era de la Biología molecular, esto es, en el estudio de la forma, agregación y orientación de las moléculas y de la estructura intramolecular de los constituyentes esenciales que componen el sistema celular como una unidad. El descubrimiento de este mundo submicroscópico es de fundamental importancia, porque entre los elementos que lo componen, como las ma-

cromolúcúlas, enzimas, sustratos y metabolitos, se producen todas las trasformaciones químicas y energéticas que caracterizan a los fenómenos vitales.

Los estudios modernos de la materia viviente demuestran que existe una combinación de niveles de organización integrados entre sí y que de esta integración resultan las manifestaciones vitales del organismo. El concepto de niveles de organización como fuera desarrollado por J. Needham¹ y otros implica que en el universo entero, tanto en el mundo inerte como en el viviente, existen diversos niveles de complejidad, de manera que "las leyes o reglas que se encuentran en un nivel pueden no aparecer en niveles inferiores". También se debe tomar en cuenta que el todo es algo más que la suma de sus partes: por ejemplo, el cloruro de sodio tiene propiedades que no están ni en el sodio ni en el cloro. Del mismo modo, las propiedades de una molécula más grande (p. ej., glucógeno) no pueden predecirse por las de sus componentes. Por el mismo razonamiento, este concepto puede aplicarse a diferentes constituyentes estructurales de una célula o a la asociación de numerosas células en el tejido.

En la figura 1-1 se representan diferentes niveles de organización biológica por medio de sectores circulares concéntricos e interrelacionados, de manera tal que el externo hace las veces de medio para el interno. Lo intrincado de las relaciones entre los diferentes niveles está indicado por la red de flechas que los interconecta, dando una idea de la complejidad de la materia viviente.

A pesar de estas similitudes, existen diferencias fundamentales entre la materia viviente y la inorgánica. De acuerdo con nuestros conceptos actuales, mientras en el mundo no viviente existe una tendencia continua a alcanzar un equilibrio termodinámico con una distribución al azar de la materia y la energía, en el organismo viviente se mantiene un alto grado de estructura y función por medio de trasformaciones energéticas basadas en la continua entrada y salida de materia y energía.²

LÍMITES Y DIMENSIONES EN BIOLOGÍA

La tabla 1-1 revela de modo más bien esquemático los límites que separan el estudio de los sistemas biológicos en diferentes niveles de dimensión. En esta clasificación los lí-

mites entre los distintos niveles de organización están impuestos artificialmente por el poder de resolución del instrumento empleado, observándose que existe una gran superposición. El ojo humano sólo puede resolver (discriminar) dos puntos que estén separados por más de 0.1 mm (100 μ). La mayoría de las células, en general, son mucho menores y necesitan todo el poder de resolución del microscopio óptico (0.2 μ) para ser estudiadas. A su vez, la mayor parte de las estructuras subcelulares son aún más pequeñas y requieren la resolución del microscopio electrónico.

Desde el punto de vista morfológico, todos estos campos de la Biología corresponden a la disciplina de la *Anatomía* (cortar en pedazos), que etimológicamente implica la separación de los diferentes componentes, de tal manera que puedan ser identificados y estudiados como partes aisladas y en su integración dentro del organismo entero. Bennett,³ en una penetrante interpretación de estos conceptos, dice que "los métodos operativos de todas las ramas de la Anatomía tienen características similares". Quienes trabajan en el campo de la anatomía macroscópica, microscópica o molecular generalmente proceden a separar los objetos de interés. El método es el mismo si se emplea un escalpelo para diseccionar el cadáver, o se realizan cortes para observarlos con el microscopio óptico o electrónico, o bien se separan por homogeneización y centrifugación los componentes subcelulares. También en esta categoría entraría la resolución de las diferentes estructuras y de elementos moleculares o atómicos por medio de instrumentos ópticos que emplean diversas ondas electromagnéticas (fig. 1-2).

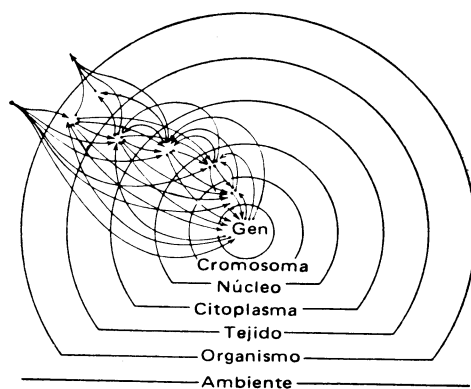


FIG. 1-1. Los niveles de organización biológica están representados por sectores circulares concéntricos e interrelacionados. (Cortesía de P. Weiss.)

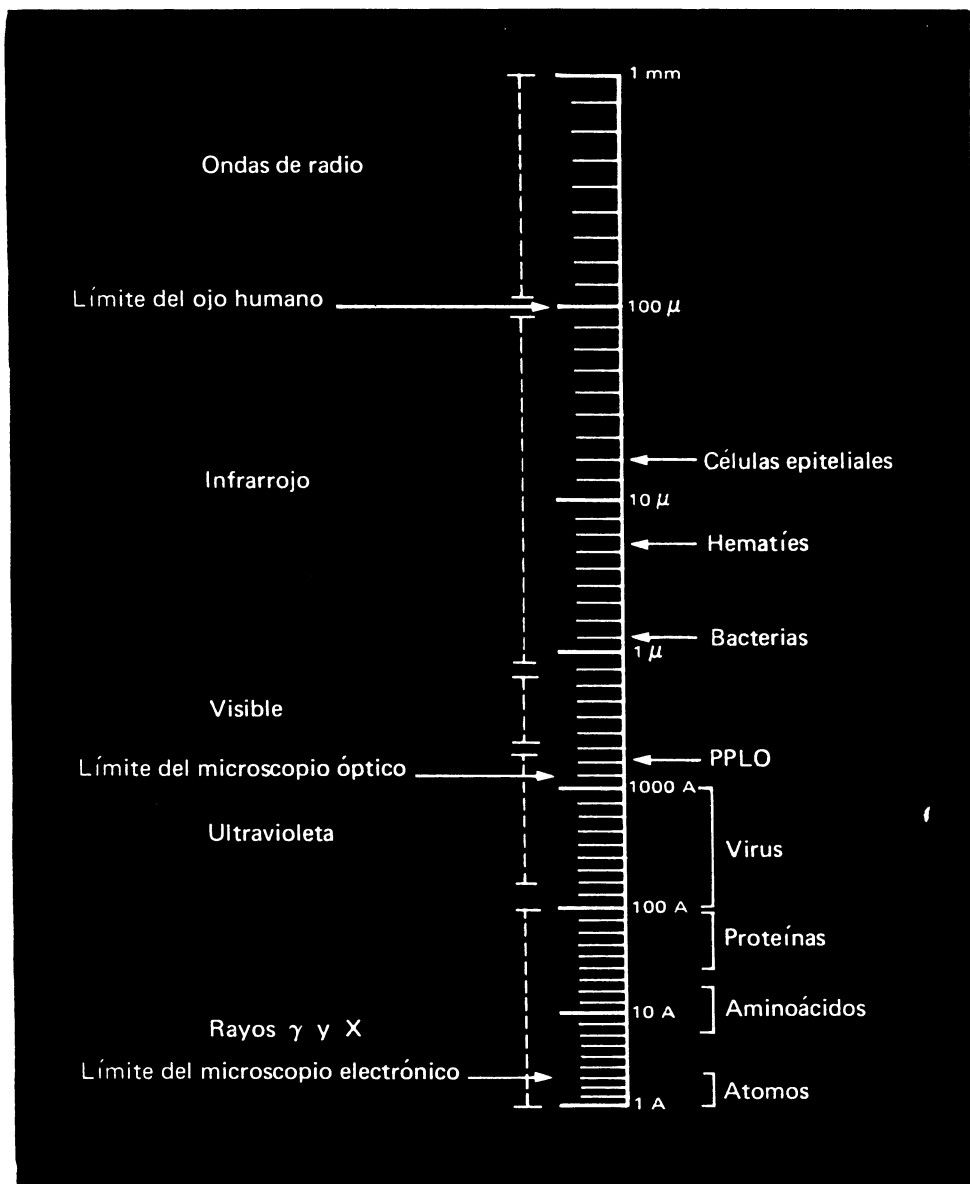


FIG. 1-2. *Escala logarítmica de las dimensiones microscópicas.* Cada división principal representa un tamaño 10 veces menor que la precedente. A la izquierda se indica la posición de las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético y los límites del ojo humano, la luz y el microscopio electrónico. A la derecha están los tamaños de las diferentes células, bacterias, PPLO (el organismo más pequeño), virus, moléculas y átomos. (De M. Bessis, modificado.)

Para obtener una imagen de la organización molecular de un sistema biológico es necesario partir del conocimiento de las principales moléculas que lo constituyen, en particular de aquellas de alto peso molecular como los ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos. Los lípidos, aunque de menor peso

molecular, desempeñan también un importante papel como componentes estructurales de la célula. Con el fin de situar estos componentes dentro de la estructura organizada, junto con el agua y las pequeñas moléculas, deben ser estudiados desde el punto de vista de su tamaño, forma, carga eléctrica, caracte-

ísticas estereoquímicas y principales grupos químicos. Tal estudio es difícil cuando se aíslan las moléculas o éstas se encuentran distribuidas al azar. Sin embargo, con frecuencia las moléculas se disponen entre sí en estructuras periódicas repetidas susceptibles de analizarse con técnicas cristalográficas. De éstas, las más precisas y las que poseen mayor resolución son las de difracción de rayos X, que permiten no sólo determinar la configuración molecular del cristal, sino también la disposición tridimensional de los átomos dentro de la molécula. En los últimos tiempos se han realizado grandes avances en el análisis detallado de la configuración molecular de las proteínas, ácidos nucleicos y aun de complejos moleculares mayores, como ciertos virus. Este campo importante se denomina actualmente *Biología molecular* (tabla 1-1).

En un nivel citológico, a la *ultraestructura* o *morfología submicroscópica* le atañen las unidades más grandes que pueden ser analizadas con técnicas microscópicas. La primera en ser aplicada hace un siglo aproximadamente fue la *microscopia de polarización*. Investigadores alemanes, comenzando por Nägeli, fueron los primeros en reconocer estructuras ordenadas dentro de los sistemas biológicos. Más tarde, dichos estudios se realizaron cuantitativamente y se extendieron en forma considerable por el trabajo importante de W. J. Schmidt. Esta técnica (véase cap. 5) se basa en el efecto que producen estructuras anisótropas sobre la luz polarizada. Por último, el instrumento más importante para el estudio de la morfología submicroscópica es el *microscopio electrónico*. Con este instrumento se puede obtener una información directa de

estructuras que oscilan entre 4 y 2000 Å o más, uniendo por tanto la separación que existe entre las observaciones realizadas con el microscopio óptico y el mundo de las macromoléculas. Los resultados obtenidos por medio de la aplicación de la microscopia electrónica han cambiado tanto el campo de la Citología que gran parte de este libro discute los resultados obtenidos con esa técnica.

En la figura 1-2 se indica el tamaño de las diferentes células, bacterias, virus y moléculas en escala logarítmica y se las compara con las longitudes de las diferentes radiaciones, lo mismo que los límites de resolución del ojo, microscopio óptico y electrónico. Se puede advertir que el microscopio óptico (límite de resolución = 2000 Å) introduce un aumento de 500 veces en la resolución del ojo (10^6 Å), y el microscopio electrónico (4 Å), un aumento 500 veces mayor que el del microscopio óptico.

Algunas estructuras citológicas pueden ser discriminadas con el microscopio óptico, como las mitocondrias, centríolos, cromosomas y nucléolos; pero a muchas otras, que serán estudiadas en diversas partes de este libro, sólo es posible observarlas mediante el microscopio electrónico: ribosomas, membrana plasmática, miofilamentos, microfibrillas cromosómicas, microtúbulos, vesículas sinápticas, etcétera.

La mayoría de las dimensiones moleculares, en tanto, están muy por debajo de estos límites. Así, una molécula de glucosa tiene un diámetro de sólo 5 Å, y serían necesarias un billón de ellas para constituir la partícula más pequeña visible con el microscopio óptico. Para formar una mitocondria se necesita-

TABLA 1-1. Ramas de la morfología

<i>Dimensión</i>	<i>Rama</i>	<i>Estructura</i>	<i>Método</i>
0.1 mm (100 μ) y más	Anatomía	Órganos	Ojo y lente simple
100 - 10 μ 10 - 0.2 μ (2000 Å)	Histología Citología	Tejidos Células Bacterias	Varios tipos de microscopios ópticos Microscopia de rayos X
2000 - 10 Å	Morfología submicroscópica Ultraestructura	Componentes celulares Virus	Microscopia de polarización Microscopia electrónica
Menos de 10 Å	Biología molecular		
	Estructura molecular y atómica	Disposición de los átomos	Difracción de rayos X

ría un millón de partículas del tamaño de una molécula proteica (100 Å).

En varios capítulos de este libro se darán ejemplos de diversos niveles de organización de las estructuras biológicas que resultan del empleo de los diferentes instrumentos de aumento, pero desde el comienzo el lector debe estar enterado de la importancia de estos conceptos y observar los niveles apropiados de organización —anatómico, histológico, citológico, ultraestructural o molecular— que está considerando (tabla 1-1).

En la tabla 1-2 se incluyen otras unidades con las que el lector ha de familiarizarse. En ella se presentan las relaciones generales existentes entre algunas de las dimensiones lineales utilizadas en Citología y el peso del ma-

encuentra en contacto directo con el resto del protoplasma. Desde el punto de vista histórico, es interesante recordar que Haeckel postuló en 1868, como forma más primitiva de sustancia organizada, a la llamada “monera”, es decir, “masas de proteínas homogéneas y amorfas”, que él pensó se formaban directamente de la sustancia inorgánica.

El descubrimiento de los *virus* a fines del siglo pasado arrojó nueva luz sobre nuestro conocimiento de los organismos más primitivos. Conocidos al principio por su propiedad de pasar a través de los filtros de porcelana y por los cambios patológicos que producen en la célula, todos los virus se encuentran al alcance del microscopio electrónico y pueden ser conocidos morfológicamente y estudiados

TABLA 1-2. Relaciones entre las dimensiones lineales, pesos y citoquímica
(De Engström y Finean, 1958)

Dimensión lineal	Peso	
1 cm	1 g	Bioquímica convencional
1 mm	1 mg, 10^{-3} g	Microquímica
100 μ	1 μ g, 10^{-6} g	Histoquímica { Ultramicroquímica
1 μ	1 μ g (o 1 picogramo o 10^{-12} g)	Citoquímica }

terial empleado en los diferentes campos de análisis químico de la materia viviente. Como se advertirá en otros capítulos, los componentes importantes de la célula se expresan en picogramos (1 pg = 10^{-12} g) o en peso molecular (PM). La unidad de peso molecular es el Dalton. Por ejemplo, una molécula de agua pesa 18 Daltons y una de hemoglobina 64,500 Daltons.

Organismos procariontes y eucariontes

Es importante introducir en este punto el concepto de que las células con núcleo y citoplasma, así como todos los organoides celulares que se describirán en este libro, no son las masas más pequeñas de materia viviente o protoplasma (del griego: *protos*, primero, y *plasma*, formación). Existen unidades de vida más simples o primitivas. Así, a diferencia de los tipos más desarrollados de células provistos de un núcleo verdadero, los *eucariontes*, en los organismos denominados *procariontes* (del griego: *carion*, núcleo), que comprenden la mayoría de los virus, bacterias y algunas algas, no existe membrana nuclear y la sustancia nuclear se mezcla o se

en su organización macromolecular. Aunque los virus tienen propiedades comunes con los organismos vivientes, como la autorreproducción, herencia y mutación, dependen fundamentalmente de la célula huésped. Por ser parásitos obligados, es difícil considerarlos como a los organismos más primitivos.

La célula bacteriana

Si bien este libro está dedicado a las células más complejas, de tipo eucarionte, la mayor parte de nuestro conocimiento actual en Biología molecular se origina en el estudio de virus y bacterias. Una célula bacteriana, como la *Escherichia coli* (*E. coli*), presenta la ventaja de su fácil cultivo en una solución acuosa de glucosa y iones inorgánicos. En tal medio, a 37°C, duplica su masa celular y se divide aproximadamente a los 60 minutos. Este lapso puede ser reducido al límite de 20 minutos —el tiempo de generación— si se agregan al medio bases púricas y pirimídicas (precursoras de los ácidos nucleicos).

Como demuestra la figura 1-3, una *E. coli* mide alrededor de 2 μ (20,000 Å) de longitud por 0.8 μ (8000 Å) de ancho. Se encuen-

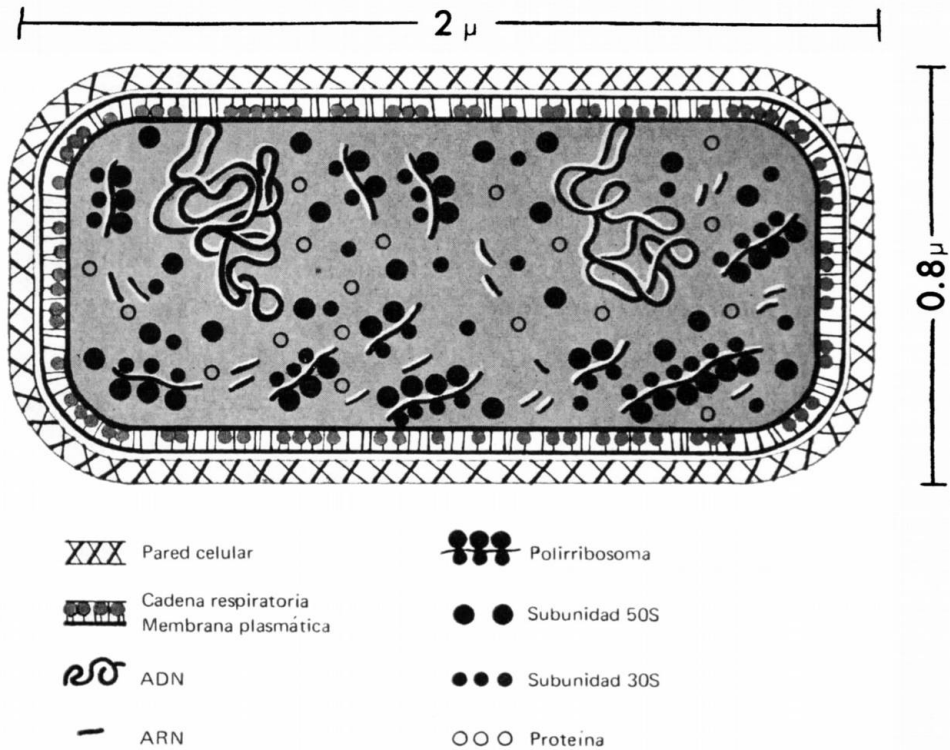


FIG. 1-3. Esquema de *E. Coli*, que contiene dos cromosomas de 1 mm de largo (10^7A), los cuales están adheridos a la membrana celular.

tra rodeada de una rígida *pared celular* que contiene moléculas proteicas, lipídicas y polisacáridos. Por dentro de la pared celular existe una verdadera *membrana celular* o *plasmática*, estructura lipoproteica que constituye una barrera molecular para el medio externo. Esta membrana, controlando la entrada y salida de pequeñas moléculas y iones, contribuye al establecimiento de un medio interno para el protoplasma bacteriano. Es interesante destacar que, en relación con la membrana plasmática, hay enzimas vinculadas con la oxidación de metabolitos que componen la *cadena respiratoria* (en células eucariontes dichas enzimas se hallan dentro de organoides citoplásmicos, las mitocondrias). Mediante el microscopio electrónico (fig. 1-4) es posible reconocer regiones más claras (a menudo llamadas *nucleoides*), donde se encuentra el cromosoma de la bacteria, formado por una sola molécula circular de ácido desoxirribonucleico (ADN). Éste mide alrededor de 1 mm de largo (10^7A), y contiene toda la información genética del organismo. El ADN se encuentra libre en el protoplasma y no está separado de éste por una membrana nuclear, como ocu-

rre en la célula eucarionte. Rodeando al ADN, en la región más oscura del protoplasma (figura 1-4), existe gran número de partículas (20,000 - 30,000) de alrededor de 200 A, los *ribosomas*, compuestas de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Como se estudiará más adelante, en estas partículas tiene lugar la síntesis proteica. Los ribosomas se agrupan formando *polirribosomas* o *polisomas*, y también se encuentran separados en subunidades grandes y pequeñas.

El resto de la célula se compone de agua, diferentes tipos de ARN y proteínas, y otras moléculas más pequeñas. Hay aproximadamente entre 3000 y 6000 tipos de moléculas en una sola *E. coli*. El ADN de esta bacteria contiene suficiente información genética como para codificar de 2000 a 3000 proteínas diferentes.

La masa más pequeña de materia viviente

De lo que se ha dicho de la *E. coli* es evidente que debe existir un límite inferior de tamaño para la célula. De hecho, ésta ha de

ser lo suficientemente grande como para: a) poseer membrana plasmática; b) contener el material genético suficiente para codificar los diversos ARN que intervienen en la síntesis proteica, y c) tener la maquinaria biosintética necesaria para que esta síntesis ocurra.

Entre los agentes que poseen la más pequeña masa viviente, se hallan los microbios del grupo de la pleuroneumonía (PPLO) (figura 1-2), productores de enfermedades infecciosas en diferentes animales y el hombre, y que pueden ser cultivados *in vitro* como cualquier otra bacteria. Estos agentes varían en diámetro entre 0.25 μ , justo el límite de resolución del microscopio óptico, y 0.1 μ ; por tanto, su tamaño corresponde al de algunos virus grandes.

La importancia biológica del microbio citado radica en el hecho de que su masa viviente es mil veces menor que el tamaño promedio de una bacteria (diámetro = 1 μ) y un millón de veces menor que una célula eucarionte.⁴ El estudio de estos organismos elementales y de las bacterias en general es de interés principalísimo para la Biología celular, porque representan la simplificación extrema de los diversos patrones de estructura y función que se encontrarán en células superiores.

HISTORIA DE LA CITOLOGÍA

La Citología (o como se la denomina actualmente, Biología celular) es una de las ramas más jóvenes de las ciencias naturales. Como tal fue reconocida a fines del siglo pasado. Su temprana historia está íntimamente unida al desarrollo de las lentes ópticas y a la combinación de ellas para construir el microscopio compuesto (del griego: *mikros*, pequeño; *skopein*, ver, examinar).

El nombre de célula (del griego: *kytos*, célula; del latín: *cella*, espacio vacío) fue empleado por primera vez por Robert Hooke (1665) al describir sus investigaciones sobre "la textura del corcho por medio de lentes de aumento". En estas observaciones, repetidas por Grew y Malpighi en diversos vegetales, se examinaron solamente las cavidades, "utrículos" o "vesículas", constituidas por la pared celulósica. En el mismo siglo y al comienzo del siguiente, Leeuwenhoek (1674) reconoció la existencia de células libres como opuestas a las células "empotradas" de Hooke y Grew, y observó cierta organización dentro de ellas, en especial en el núcleo de algunos

eritrocitos. Este conocimiento permaneció estacionario por más de una centuria.

Teoría celular

Más directamente relacionado con el origen de la Biología celular fue el establecimiento de la *Teoría Celular* (Schwann, 1839), la más amplia y fundamental de todas las generalizaciones biológicas. Establece en su forma actual que los seres vivientes, animales, vegetales o protozoarios, están compuestos sin excepción por células y productos celulares. Esta teoría resultó de numerosas investigaciones que comenzaron al principio del siglo XIX (Mirbel, 1802; Oken, 1805; Lamarck, 1809; Dutrochet, 1824; Turpin, 1826, etcétera) y que finalmente condujeron al botánico Schleiden en 1838 y al zoólogo Schwann en 1839 a establecerla en su forma definitiva.

La Teoría Celular ha iluminado todos los campos de la investigación biológica. Como consecuencia inmediata se estableció que cada célula se forma por división de otra célula. Más tarde, por el progreso de la Bioquímica, se demostró que existen semejanzas fundamentales en la composición química y actividades metabólicas de todas las células. También se reconoció que el funcionamiento de un organismo como una unidad es el resultado de la suma de las actividades e interacciones de las unidades celulares.²

Virchow (1858) aplicó en seguida la Teoría Celular a la Patología, y Kölliker la extendió a la Embriología después que se demostró que el espermatozoide y el óvulo eran células de cuya fusión se desarrolla el organismo.

En la misma época se alcanzó un punto de vista más biológico y general, debido a investigadores como Brown (1831), al establecer que el núcleo es un componente fundamental y constante de la célula. Otros (Dujardin, Schultze, Purkinje, von Mohl) se concentraron en la descripción del contenido celular, denominado *protoplasma*. Así, el concepto primitivo de célula se transformó en el de una masa de protoplasma, limitado en el espacio por una membrana celular y que posee un núcleo. El protoplasma que rodea al núcleo fue conocido por *citoplasma*, en oposición al *carioplasma* o protoplasma del núcleo.

Una vez que se establecieron estas teorías y conceptos fundamentales, el progreso del conocimiento citológico fue sumamente rápido. Las modificaciones extraordinarias que se

producen en el núcleo en cada división celular atrajeron la atención de gran número de investigadores. Como consecuencia de ello se descubrió el fenómeno de la *amitosis* o división directa (Remak), mientras que la división indirecta fue descubierta por Flemming en animales y por Strasburger en vegetales. A esta última se la denominó también *cariocinesis* (Schleicher, 1868) o *mitosis* (Flemming, 1880). Se comprobó que el hecho fundamental en la mitosis es la formación de los filamentos nucleares o *cromosomas* (Waldeyer, 1890) y su división igual entre los núcleos de las células hijas. Otro descubrimiento de importancia fue el de la fertilización del óvulo y la fusión de los dos pronúcleos (O. Hertwig, 1875). Se descubrieron en el citoplasma de la célula el centro celular (van Beneden, Boveri), las mitocondrias (Altmann, Benda) y el aparato reticular (Golgi).

Simultáneamente con el estudio de los tejidos o agregados celulares, los biólogos se concentraron cada vez más en la célula, considerada como la unidad fundamental de la vida. En 1892, O. Hertwig publicó su monografía denominada "Die Zelle und das Gewebe", en la que, basándose en las características de la célula, su estructura y función, trató de realizar una síntesis general de los fenómenos biológicos. Demostró en este libro que la solución de los problemas biológicos debe buscarse en los procesos celulares, creando de este modo la Citología como una rama separada de la Biología. Es interesante que en las últimas ediciones su libro se denominara "Biología General". Para revisiones actuales sobre la historia de la Citología véanse ⁵ Caullery y Leroy (1966), y E. Nordenskiöld (1966).

ESTADO ACTUAL DE LA BIOLOGÍA CELULAR

Si se sigue la historia de la Biología celular en este siglo es evidente que el conocimiento citológico ha avanzado en función de dos causas principales. La primera es el aumento del poder resolutivo de los instrumentos de análisis y en especial las técnicas de microscopía electrónica y de difracción de rayos X. La segunda consiste en la convergencia con otros campos de la investigación biológica, particularmente con la Genética, Fisiología y Bioquímica. Esto ha resultado de la aplicación de métodos físicos y químicos al estudio de la célula y de una integración de los conceptos, que finalmente abolieron los límites artificiales entre estas ciencias. Como consecuencia directa, nuestros conocimientos biológicos se han establecido más firmemente sobre la base de la célula y de su constitución molecular.

En las secciones siguientes trataremos de dar en

términos generales los resultados que ha tenido la coincidencia de estos campos en los modernos aspectos y orientaciones actuales de la Biología celular y molecular.

Citología y Genética: Citogenética

Al promediar el siglo XIX se había establecido la universalidad de la división celular como el fenómeno central en la reproducción de los organismos, y Virchow lo expresó en su famoso aforismo "Omnis cellula e cellula". A partir de entonces comienza a producirse la convergencia entre el estudio de las células y de la herencia y evolución, como fuera expuesto con suma exactitud por Wilson. "La herencia aparece como una consecuencia de la continuidad genética de las células establecida por la división."

Las observaciones realizadas por van Beneden, Flemming, Strasburger, Boveri y otros sobre la célula germinativa sirven de base a la célebre teoría de la continuidad del plasma germinativo, propuesta por Weissmann en 1883 para explicar la trasmisión de los caracteres hereditarios. Esta teoría establece que la trasmisión de los factores hereditarios de una generación a otra tiene lugar por medio de la continuidad de lo que él denominó *plasma germinativo*, localizado en los elementos sexuales (espermatozoides y óvulo), y no mediante las células somáticas.

El descubrimiento de la fecundación en los animales realizado por O. Hertwig, pero observada directamente por H. Fol (1879), y en los vegetales por Strasburger, condujo a la enunciación de la teoría según la cual el núcleo celular es el portador de las bases físicas de la herencia. Además, Roux postuló que la cromatina, la sustancia del núcleo que constituye los cromosomas, debe estar dispuesta en forma lineal, y Weissmann sugirió que las unidades hereditarias se disponen ordenadamente a lo largo de los cromosomas.

Las leyes fundamentales de la herencia fueron descubiertas por Gregorio Mendel en 1865; pero en esa época no se conocían suficientemente bien los cambios producidos en las células sexuales como para permitir una interpretación de la segregación independiente de los caracteres hereditarios (véase cap. 14). Por esto y por otras razones, los estudios de Mendel cayeron en el olvido, hasta que los botánicos Correns, Tschermack y De Vries, en 1901, redescubrieron independientemente las leyes de Mendel (Olby, 1966). En ese momento la Citología había avanzado lo suficiente como para comprender y explicar el mecanismo de distribución de las unidades hereditarias como fuera postulado por Mendel. Se sabía que en los organismos sexuados las células somáticas tenían una constitución hereditaria doble o *diploide*, mientras que en las células reproductoras o gametos esta constitución era simple o *haploide*. Además, los citólogos observaron que el ciclo que experimentan los cromosomas en la *meiosis* de las células germinativas estaba relacionado con los fenómenos hereditarios.

En relación directa con estos descubrimientos, McClung (1901-1902) sugirió que la determinación del sexo estaba vinculada con ciertos cromosomas especiales, lo cual fue corroborado por Stevens y Wilson (1905). La demostración experimental de la teoría cromosómica de la herencia corresponde a Boveri y Baltzer, pero fueron Morgan y sus colaboradores, Stutevant y Bridges, quienes asignaron a los *genes* (Johannsen) o unidades hereditarias la loca-

lización dentro de los cromosomas. A partir de ese momento la investigación experimental de la herencia y evolución hizo que ésta se separara como una rama de la Biología, que en 1906 Bateson bautizó con el nombre de *Genética*. Sin embargo, la ciencia de la genética casi desde el principio mantuvo íntima relación con la Citología y de la convergencia de ambas se originó la Citogenética (véase cap. 14). En la última década el estudio de la Genética se ha unido a la Bioquímica, alcanzando el nivel molecular y estableciéndose de este modo los nuevos campos de la Genética bioquímica y molecular (véase capítulo 19).

Citología y Fisiología: Fisiología celular

En un principio, la mayor parte del conocimiento citológico se basaba en observaciones de células y tejidos fijados y coloreados. Esto condujo a la formulación de diferentes teorías que tenían en cuenta la estructura fisicoquímica del protoplasma. En 1899 comenzó una reacción, en particular con los trabajos de Fischer y Hardy, quienes demostraron que varias de las estructuras observadas en células fijadas podrían ser reproducidas por la acción de fijadores sobre modelos coloidales. Ello contribuyó a despertar el interés por el estudio de la célula viviente. Se estudiaron al nivel celular diversos tipos de movimientos, como la cicloisis o corriente citoplásmica, movimientos ameboides, ciliar y flagelar, y la contracción muscular.

Al finalizar el siglo XIX, Overton adelantó la teoría de que la membrana celular era una película lipídica. Michaelis realizó modelos de membranas para estudiar el pasaje de sustancias e hizo la primera coloración vital de mitocondrias. Sin embargo, la coloración vital (con azul de metileno) fue introducida por primera vez por Ehrlich en 1881. El concepto básico de irritabilidad celular y función nerviosa quedó establecido a mediados del siglo pasado por Du Bois Reymond y luego se desarrollaron técnicas fisiológicas para el estudio de estas células y para medir los potenciales de acción y corrientes nerviosas.

Un importante camino en el estudio de la célula viviente se abre en 1909, cuando Harrison demostró que las células nerviosas de un embrión podían crecer y diferenciarse *in vitro*. Esto dio lugar a la técnica del *cultivo de tejidos* que, junto con el trabajo de Carrel, tuvo gran repercusión sobre la Citología y continúa hasta ahora desarrollándose en muchos aspectos diferentes. Uno de los principales resultados de esta técnica fue la demostración de que, como en los Protozoarios, las células de los Metazoarios son potencialmente inmortales. De hecho, el cultivo de Carrel de corazón embrionario ha sido mantenido desde 1912 a través de miles de generaciones celulares. Con el aislamiento de cepas puras de células, el cultivo de tejidos se ha convertido en una técnica ideal para el estudio de la estructura y comportamiento de las células vivientes. Este análisis se perfeccionó con la introducción de la microscopía de contraste de fase y el empleo de colorantes vitales y de la microcinematografía (Lewis y Lewis, Pomerat).

Otro método para el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las células vivientes, la microcirugía, provino del campo de la Bacteriología. A comienzos de este siglo Schouten y Barber emplearon delgadas micropipetas movidas por instrumentos de

precisión para aislar y cultivar bacterias aisladas. En 1911, Kite adaptó este método a la Citología. Al introducir una microaguja entre los dos pronúcleos de un huevo recientemente fecundado, observó que trataban de vencer la resistencia interpuesta y completar la conjugación. Levi, Peterfi, Chambers y otros perfeccionaron técnicas de operaciones intracelulares y obtuvieron datos acerca de la viscosidad, concentración de hidrogeniones, potencial redox, relación núcleo-citoplasma y otros problemas fisicoquímicos. Entre los aspectos importantes estudiados por esta rama de la Biología celular se encuentran: la naturaleza de la membrana celular y el transporte activo a través de las membranas, la reacción de las células a cambios del medio, el mecanismo básico de la excitabilidad celular y la contracción, el estudio de la nutrición, crecimiento, secreción y otras manifestaciones de la actividad celular.

Citología y Bioquímica: Citoquímica

Otra de las líneas modernas de la Biología celular es la Citoquímica, que ha resultado de la convergencia con métodos y ciencias dedicados al análisis químico y fisicoquímico de la materia viviente. Se destacan, entre muchos otros, los estudios bioquímicos de Fischer y Hofmeister, quienes en 1902 reconocieron independientemente que la molécula proteica está constituida por un número relativamente pequeño de aminoácidos unidos por puentes peptídicos. De similar importancia para la Biología celular fueron las primeras investigaciones de Miescher (1869) y Kossel (1891), que por el análisis de células del pus, espermatozoides, eritrocitos hemolizados de aves y otros tipos celulares aislaron los ácidos nucleicos, cuyo papel básico en la herencia y en la síntesis proteica sólo se ha reconocido recientemente.

Para el pensamiento biológico fue muy importante introducir el concepto de la actividad catalítica, realizado por Ostwald, y el descubrimiento de que las enzimas son las entidades moleculares empleadas por la célula para producir diversos tipos de transformaciones energéticas necesarias para mantener las actividades vitales. Los principales tipos de oxidaciones celulares fueron establecidos por Wieland (1903) y Warburg (1908), pero el mecanismo final lo esclareció mucho después Keilin (1934). Es interesante recordar que Altmann predijo la relación entre las mitocondrias y las oxidaciones celulares. Batelli y Stern y Warburg, en 1912 y 1913, respectivamente, ya habían observado que las enzimas respiratorias se encontraban presentes en algunas partículas citoplásmicas.

Los citólogos, debido a su énfasis sobre la morfología, fueron muy lentos al principio en apreciar la importancia de los métodos bioquímicos; por su parte, los bioquímicos, concentrados en la Química orgánica, no tenían interés por la estructura celular y se ocupaban principalmente en aislar los componentes químicos y estudiar sus reacciones enzimáticas elementales. F. G. Hopkins,⁶ ya al comienzo de este siglo, subrayó la necesidad de que los bioquímicos fueran biólogos y químicos al mismo tiempo.

El punto de convergencia es relativamente reciente y puede buscárselo hacia el año 1934, cuando Bensley y Hoerr aislaron mitocondrias de células por medio de homogeneización y centrifugación diferencial, en cantidades lo suficientemente grandes como para permitir el análisis con métodos químicos y fisicoquímicos.

Dicha dirección, seguida con gran éxito por Claude, Hogeboom y otros, condujo a la conclusión de que las mitocondrias son el centro de las oxidaciones celulares. El aislamiento de otras fracciones celulares siguió a este estudio inicial.

Para la Biología y la Bioquímica tuvieron gran importancia los avances en el fraccionamiento celular, especialmente con el desarrollo de técnicas de marcación con radioisótopos que permiten un método dinámico para el estudio del metabolismo de las células. Del mismo modo se avanzó mucho con el empleo del microscopio electrónico para observar y caracterizar las fracciones celulares. Estos progresos han conducido recientemente al aislamiento, no sólo de mitocondrias, sino también de cloroplastos, nucleólos, terminaciones nerviosas, complejo de Golgi, núcleos, cromosomas, ribosomas, aparato mitótico y otros componentes celulares que serán descritos en los diversos capítulos de este libro.

La Citoquímica moderna también se ha desarrollado a lo largo de las líneas del análisis microquímico y ultramicroquímico con el empleo de técnicas para determinar cantidades mínimas de material y el aislamiento de células aisladas y aun de partes de las células (tabla 1-2). Se pueden llevar a cabo análisis químicos por citofotometría, que permiten estudiar la localización de los ácidos nucleicos y de las proteínas dentro de partes de una célula. Las técnicas que se basan en propiedades físicas, por ejemplo la fluorometría y absorción de rayos X, han dado interesantes resultados.

Otra línea importante de la Citoquímica proviene de la aplicación de numerosas reacciones enzimáticas que pueden observarse con el microscopio óptico y el electrónico. Este último método es de particular interés, puesto que permite combinar la Citoquímica con la Ultraestructura y estudiar así la localización de enzimas en el nivel de resolución del microscopio electrónico. Son de importancia similar los estudios sobre la localización de isótopos radiactivos en diferentes estructuras celulares realizados por medio de la radioautografía.

Ultraestructura y Biología molecular

Al estudiar los límites y dimensiones en Biología (tablas 1-1 y 1-2) se mencionó la importancia del análisis instrumental y se delinearon los modernos campos de la Ultraestructura y de la Biología molecular. Estas son las ramas más avanzadas de la Biología en las cuales la combinación de la Citología se ha hecho paulatinamente con la Bioquímica, Fisiología y en especial con la Química macromolecular y coloidal. El conocimiento de la organización submicroscópica o la ultraestructura de la célula es de interés fundamental, porque prácticamente todas las transformaciones funcionales y fisicoquímicas se producen en la arquitectura molecular de la célula.

Además, como ha sido tan bien dicho por Heller y col.,⁷ "la Biología molecular no puede ser considerada como algo que está separado de la Bioquímica y de la Biofísica. No existe en la Biología molecular problema alguno que no requiera métodos biofísicos o bioquímicos". Por el contrario, el descubrimiento en la estructura de una molécula proteica de la exacta secuencia de los aminoácidos y la disposición tridimensional de la cadena polipeptídica van parejos con el de las propiedades biológicas de ciertas proteínas. Los estudios sobre

los grupos activos en diferentes enzimas (véase cap. 5), el modelo molecular de ADN sugerido por Watson y Crick en 1953 (véase cap. 4), así como el conocimiento reciente sobre la esteoquímica de las macromoléculas tienen extraordinaria repercusión en Biología. Por tanto, la Biología molecular está iluminando los campos de la Genética a través de la Genética molecular (véase cap. 19), de la Bioquímica y aun de la Patología; la última con el establecimiento de enfermedades moleculares. Para consultar dos interesantes revisiones sobre historia de la Biología molecular se remite al lector a los artículos de Stent (1968) y Herrmann (1968).

Tanto en la Ultraestructura como en la Biología molecular, la integración entre morfología y fisiología se ha hecho tan íntima que es imposible separarlas. Los conceptos de forma y de función se fusionan en estos campos como unidades inseparables.

En resumen, puede decirse que la moderna Biología celular encara los problemas celulares en todos sus niveles de organización, comenzando por la estructura molecular. Es por tanto el campo común donde tiene lugar la convergencia de la Genética, Fisiología y Bioquímica. Los modernos biólogos celulares, sin perder de vista el estudio de la célula como unidad morfológica y funcional dentro del organismo, deben estar preparados para emplear los métodos, técnicas y conceptos de las otras ciencias y estudiar los fenómenos biológicos en todos los niveles. Este es un gran desafío, pero no existe otro camino si la vida de la célula y del organismo ha de ser interpretada dentro de un concepto mecanicista, es decir, sobre la base de las combinaciones y asociaciones de átomos y moléculas.

FUENTES BIBLIOGRÁFICAS EN BIOLOGÍA CELULAR

Las consideraciones precedentes acerca del alcance actual de la Biología celular explica por qué las fuentes de la literatura son tan amplias y diversas. Los estudios comunes se presentan en las reuniones científicas y se publican en revistas especializadas. Entre la larga lista que se puede hacer, permítasenos mencionar unas pocas de las más específicas: *Journal of Cell Biology*, *Experimental Cell Research*, *Journal of Molecular Biology*, *Journal of Ultrastructure Research*, *Zeitschrift für Zellforschung*, *Journal of Microscopie*, *Journal of Cell Science*, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *Journal of General Physiology*, *Chromosoma*, *Cytogenetics and Heredity*, *Hereditas*, etcétera.

Frecuentemente aparecen publicaciones sobre Biología celular en revistas más generales como *Nature*, *Science*, *Proceedings of the Royal Society*, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.*, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, *Experientia* y *Naturwissenschaften*, y aun en publicaciones especializadas como *Biochemica et Biophysica*

Acta, Biochemical Journal o en Journal of Biological Chemistry.

Se encuentran revisiones sobre los avances recientes en International Review of Cytology, Quarterly Review of Biology, Physiological Reviews, Biological Reviews, Advances in Genetics, Plant Physiology, etcétera.

Para recopilar la bibliografía existen revistas especiales que proporcionan títulos de trabajos o resúmenes de la literatura como Biological Abstracts, Index Medicus, Excerpta Medica, Chemical Abstracts, Berichte über die Wissenschaftliche Biologie, etc., que son las más útiles. Revistas como Current Contents o Bulletin Signalétique du Conseil des Recherches, publican títulos de todos los trabajos que aparecen en diversas revistas.

Además existen muchas monografías, compendios y tratados que abarcan los diferentes temas especializados de Biología celular y que se mencionarán en los diferentes capítulos de este libro. Los más recientes y de mayores alcances son sin duda *The Cell*, editado en varios volúmenes por Brachet y Mirsky, y el Handbook of Molecular Cytology (A. Lima de Faria, Ed. 1969).

Debido a la naturaleza de este libro, se darán unas pocas referencias al final de cada capítulo, que se dividirán a su vez en dos grupos. Con el título de *Bibliografía general* se da una lista de libros o artículos de revisión que pueden ser usados para lecturas suplementarias o como guía para una literatura más específica. No se ha tratado de abundar excesivamente en la literatura, y la escasa *Bibliografía citada*, mencionada por número en el texto, deberá considerarse también como clave para la reciente información en Biología Celular.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Alexander, J.: (1948) *Life: its nature and origin*. Reinhold Publishing Corp., New York.
- Baker, J. R.: Five articles evaluating the cell theory. *Quart. J. micr. Sci.*, 1948, 89:103; 1949, 90:87; 1952, 93:157; 1953, 94:407; 1955, 96:449.
- Bertalanffy, L. von: (1952) *Problems of life*. John Wiley & Sons, New York.
- Brachet, J. and Mirsky, A. E.: (1959-1961) *The cell*. 6 volumes. Academic Press, New York.
- Burnet, F. M. F.: (1946) *Virus as organism*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Cairns, J., Stent, G. S. and Watson, J. D. (eds.): (1966) *Phage and the origins of molecular Biology*. Cold Spring Harbor Labor of Quantitative Biology, New York.
- Caullery, M. and Leroy, J. F.: (1966) *Cytology and Histology*. In: *Science in the Nineteenth Century* by Rene Taton (ed.), Thames and Hudson, London and New York.
- Dawes, B.: (1952) *A hundred years of Biology*. Macmillan Co., New York.
- Heilbrunn, L. V.: (1952) *An outline of general Physiology*, 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Heilbrunn, L. V. and Weber, F. (eds.): (1953-1959) *Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung*. Springer, Vienna.
- Herrmann, H.: (1968) This is the cell Biology that is. *Bull. Inst. cell. Biol. Univ. Conn Storrs Conn.*, 10:1.
- Hughes, A.: (1959) *History of Cytology*. Abelard-Schuman, London and New York.
- Lima de Faria, A.: (ed.) (1969) *Handbook of molecular Cytology*. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Mitchell, P. H.: (1956) *A textbook of general Physiology*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Needham, J.: (1936) *Order and life*. Yale University Press, New Haven, Conn.
- Needham, J.: (1942) *Biochemistry and morphogenesis*. Cambridge University Press, London.
- Nordenskiöld, E.: (1966) *The history of Biology*. Tudor Publ. Co., New York, n.d.
- Olby, R. C.: (1966) *Origin of Mendelism*. Constable, London.
- Singer, C.: (1950) *A history of Biology*. Henry Schuman, New York.
- Stent, G. S.: (1968) That was the molecular Biology that was. *Science*, 160:390-395.
- Wald, G.: (1955) The origin of life. In: *The Physics and Chemistry of life*. Simon and Schuster, New York.
- Watson, J. D.: (1965) *Molecular Biology of the gene*. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Weiss, P.: (1962) From cell to molecule. In: *Molecular control of cell activity*. (Allen, J. M. ed.). McGraw-Hill Book Co., New York.
- Weis, P.: (1963) Cell interactions. *Canadian Cancer Conf.* 5:241-276. Acad. Press Inc., New York.
- Wilson, E. B.: (1937) *The cell in development and heredity*. Macmillan Co., New York.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Needham, J.: (1936) *Order and life*. Yale University Press, New Haven, Conn.
2. Bertalanffy, L. von: (1952) *Problems of life*. John Wiley & Sons, New York.
3. Bennett, H. S.: (1956) *Anat. Rec.*, 125:2. Proc. amer. Ass. Anatomists, p. 327.
4. Morowitz, H. J. and Tourtellotte, M. E.: (1962) *Scient. Amer.*, 206(3):117.
5. Hughes, A.: (1959) *History of cytology*. Abelard-Schuman, London and New York.
6. Hopkins, F. G.: (1947) Biological thought and chemical thought. A plea for unification. In: *Hopkins and Biochemistry* (Ed. Needham and Baldwin). Heffer, Cambridge.
7. Heller, J., Mochancka, I., Szafranski, P. and Szarkowski, J. W.: (1962) *Molecular Biology* (Polish). Kosmos, Ser. A., 11:305.

Estructura general de la célula

De acuerdo con los conceptos expuestos en el capítulo 1, ahora podemos describir a la célula como una unidad definida en la organización de la sustancia viviente, que consta de una pequeña masa de protoplasma, el citoplasma, con un núcleo y rodeada de la membrana plasmática.

En un organismo multicelular, las células tienen formas y estructuras sumamente variadas, condicionadas principalmente por la adaptación a la función específica que desempeñan en los distintos tejidos u órganos. Debido a esa especialización funcional, las células adquieren características particulares en cada caso. Sin embargo, persisten algunos atributos comunes a ellas. Esos caracteres generales son los que se estudian preferentemente en este libro. Pueden encontrarse en células poco diferenciadas, como las blastómeras o células germinativas, en las células meristemáticas de los vegetales y también en otras que poseen una organización relativamente simple, como algunos de los tejidos epiteliales o conectivos.

FORMA Y TAMAÑO DE LA CÉLULA

Ciertas células, por ejemplo las amebas y leucocitos, cambian de forma frecuentemente. Otras, como los espermatozoides, infusorios, eritrocitos, células epiteliales, células nerviosas y la mayoría de las células vegetales tienen generalmente una forma típica, más o menos fija, que es específica para cada una de ellas.

La forma de la célula depende de la tensión superficial, la viscosidad del protoplasma, la acción mecánica que ejercen las células contiguas, la rigidez de la membrana y la adaptación funcional. En el capítulo 22 se mencionará uno de los principales componen-

tes celulares relacionados con el mantenimiento de la forma celular: los microtúbulos citoplásmicos.

Muchas células, cuando son aisladas en un medio líquido, tienden a tomar la forma esférica, de acuerdo con las leyes de la tensión superficial; es el caso de los leucocitos, que en la sangre circulante son esféricos, pero fuera de los vasos emiten pseudópodos (ameboidismo) y se vuelven completamente irregulares.

Las células de diversos tejidos vegetales y animales tienen una forma poliédrica, determinada por las presiones recíprocas. En estos casos, la forma esférica originaria se modifica por el contacto con las otras células, lo mismo que en la espuma de jabón cada burbuja es comprimida por las vecinas.

Células individuales, en grandes masas, parecen comportarse como poliedros sólidos de superficie mínima, formando una masa compacta sin intersticios.

Aunque los poliedros regulares de cuatro, seis y doce caras pueden agruparse sin intersticios, los poliedros de catorce caras (o tetradecaedros) satisfacen mejor las condiciones de mínima superficie. Los estudios sobre burbujas de espuma de jabón realizados por Plateau y Lord Kelvin demostraron que estas condiciones se aplican a dichos sistemas, y que la burbuja tiene un promedio de catorce caras (fig. 2-1, A y B).

Observando la forma de las células con el microscopio, el lector siempre deberá pensar en términos de tres dimensiones y examinarlas en secciones de diferente orientación. La mejor manera de aprender acerca de la verdadera forma es realizando secciones seriadas de grosor conocido, dibujar todos los cortes y hacer reconstrucciones en cera, un pro-

cedimiento similar al usado en reconstrucciones anatómicas. En la figura 2-1, C-H, se presentan algunas reconstrucciones de diferentes tipos celulares. El tetradecaedro ideal raramente es hallado en las células, pero la reconstrucción y el recuento de superficies de gran número de diferentes células animales y vegetales, en masas apropiadas, dan un término medio muy próximo al de catorce caras.

El volumen de la célula oscila entre amplios límites. En vegetales y animales pueden encontrarse células visibles a simple vista. Así, los huevos de ciertas aves llegan a tener varios centímetros de diámetro y están constituidos, por lo menos al comienzo, por una sola célula. Esto es, sin embargo, la excepción; la gran mayoría de las células sólo son visibles con el microscopio y su diámetro es apenas de unos pocos micrones (fig. 1-2). Las células más pequeñas tienen $4\ \mu$ de diámetro. En los tejidos del hombre, si se exceptúan las células nerviosas, el volumen oscila entre 200 y 15,000 μ^3 . En general, el volumen de las células es constante para un tipo celular dado, e independiente del tamaño del individuo. Por ejemplo, las células renales o hepáticas de un buey, un caballo o un ratón tienen un tamaño casi igual. Las diferencias en la masa total de un órgano se deben al número y no al volumen de las células. Esto se conoce a veces como *ley del volumen celular constante*.

LA CÉLULA VIVIENTE

Estructura general

Las células vivientes son susceptibles de estudiarse sólo con el microscopio óptico, puesto que la observación con el microscopio electrónico sólo se puede efectuar en el vacío. Muchas células animales aisladas se observan en líquidos isotónicos, como el suero sanguíneo, humor acuoso, soluciones salinas fisiológicas o en cultivo de tejidos. Aparecen como masas irregularmente translúcidas de citoplasma en cuyo interior está el núcleo. En la figura 2-2 la mayoría de las células se hallan en interfase o período de no división (véase cap. 3) y evidencian un núcleo claro, que posee uno o más nucléolos, y un límite definido con el citoplasma, que constituye la membrana nuclear (o carioteca). Cuando las células se van a dividir, el núcleo revela varios cuerpos refringentes o *cromosomas*.

El citoplasma aparece como una sustancia amorfa, homogénea, el citoplasma fundamental, en el que se encuentran corpúsculos refringentes de tamaño diverso, entre los cuales los más característicos son las mitocondrias (fig. 2-2). Con frecuencia la capa más periférica del citoplasma, denominada *ectoplasma*, es relativamente más rígida y carece de gránulos.

Dicha zona se comporta a menudo como una

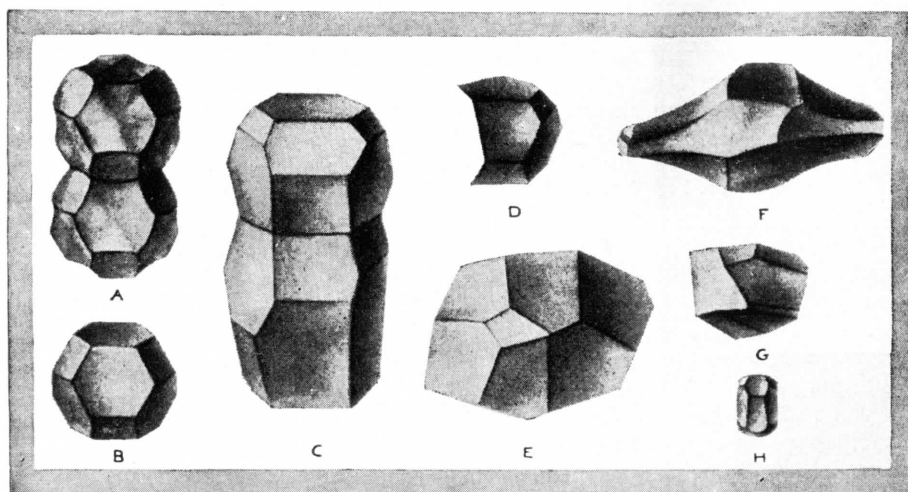


FIG. 2-1. *Reconstrucciones tridimensionales*. A y B, Tetradecaedros mínimos de Kelvin. C a H, reconstrucciones en cera de diferentes tipos celulares; E, célula adiposa humana; H, G, células basales, medias y externas del epitelio estratificado de la boca de un embrión humano de cinco meses. Aumentos aproximados: C, 170 $\times$; D, 150 $\times$; E, 300 $\times$; F, G, H, 750 $\times$. (De F. T. Lewis.)

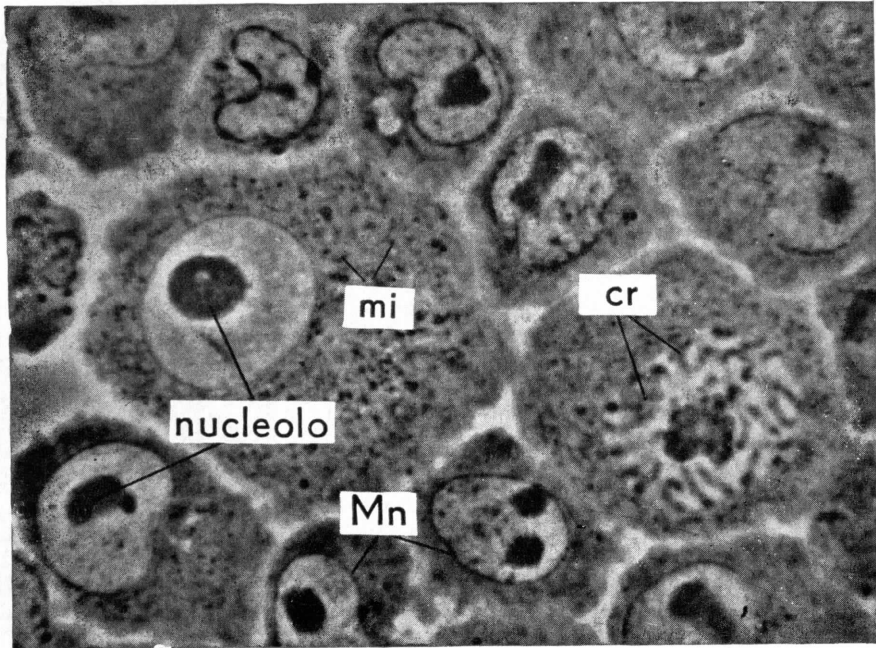


FIG. 2-2. Fotomicrografía, con contraste de fase, de células vivientes de un tumor ascítico. cr, Cromosomas; mi, mitocondrias; Mn, membrana nuclear. (Cortesía de N. Takeda.)

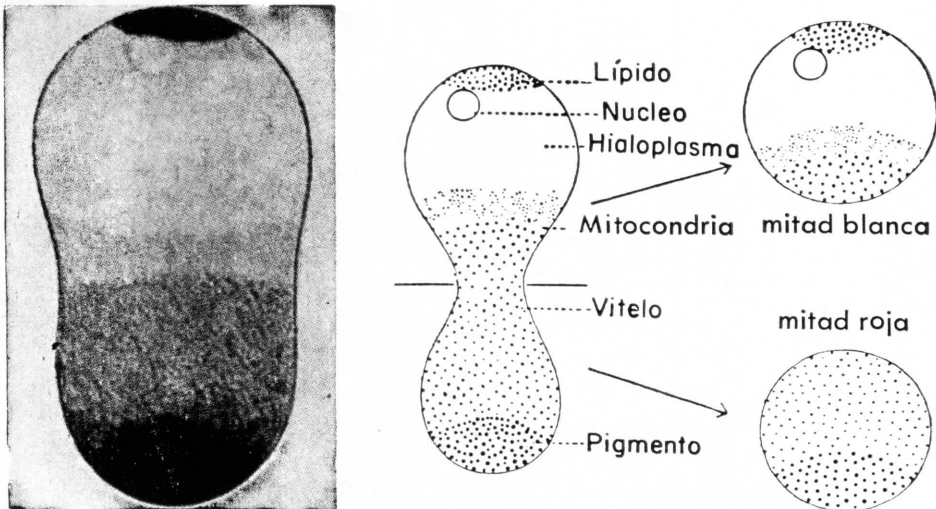


FIG. 2-3. Izquierda: Huevo de erizo de mar (*Arbacia*) sometido a la acción de la fuerza centrífuga. El huevo se ha alargado y está en vías de dividirse en dos mitades. Los materiales celulares se han estratificado (véase la descripción en el texto). (Cortesía de Costello.) Derecha: Esquema de la estratificación del huevo y su división en dos mitades. (De E. B. Harvey.)

coloide y posee la propiedad de experimentar cambios reversibles de *gelación* y *solación*. Esta transformación, bien evidente en las amebas durante la emisión de pseudópodos, es en realidad un mecanismo muy general que se aprecia en todas las células. El citoplasma interior o *endoplasma*, que contiene diferentes gránulos, tiene menor viscosidad. La célula viviente puede ser centrifugada y observarse el efecto en los componentes celulares con un microscopio especial de centrifugación.

Si los huevos de erizo de mar se someten a una intensa y prolongada centrifugación, los distintos componentes del endoplasma se estratifican de acuerdo con sus densidades, y se separa, aunque no completamente, el citoplasma fundamental de los otros componentes de la célula (fig. 2-3). El huevo se alarga primero y después se estrangula en su parte central. En el polo centrípeto se acumulan las gotas de grasa; luego, sigue una zona clara y amplia, la matriz citoplasmica, que contiene al núcleo; una capa ocupada por las mitocondrias, otra con corpúsculos de vitelo, y finalmente, en el polo centrífugo, gránulos de pigmento. La corteza, debido a su gran viscosidad y rigidez, no se desplaza con la centrifugación. Esta última propiedad parece depender de la presencia de iones de calcio, puesto que aquélla se licua cuando los huevos son tratados con sustancias que fijan dichos iones, como el oxalato.

Se han realizado interesantes estudios sobre las propiedades coloidales del citoplasma y las fuerzas fisicoquímicas que influyen en ellas (véase cap. 22). Aumentando la presión hidrostática, la corteza puede licuarse y la célula no cambia de forma. Este efecto es reversible dentro de ciertos límites. El citoplasma fundamental se comporta por lo común como un sistema coloidal sol-gel reversible y este cambio puede ser producido a veces por medios mecánicos. La propiedad se denomina generalmente *tixotropismo* (del griego *thixis*, contacto, y *trope*, un cambio).

Además de las mitocondrias, se distinguen diferentes partículas en las células vivientes, como gotas de grasa que tienen gran refringencia, plaquetas vitelinas, pigmentos y gránulos de secreción. La mayoría de estos cuerpos son productos elaborados por la célula que pueden encontrarse en cantidades variables y se denominan *inclusiones*, *deutoplasma* (del griego: *deuteros*, segundo) o *paraplasma*. En las células vegetales vivientes, aparte de las mitocondrias, se observan diversos gránulos lla-

mados *plástidos*. Entre éstos se hallan los *cloroplastos*, que contienen un pigmento verde; la clorofila, cuya función es la *fotosíntesis*, proceso de importancia capital en el mundo biológico, y también los *leucoplastos*, o plástidos incoloros, que en ciertas condiciones pueden convertirse en cloroplastos o en plástidos de distintos colores (cromoplastos), acumular almidón (aminoplastos) o aceites, o realizar otras funciones (véase cap. 12).

Tanto en las células animales como en las vegetales, pero preferentemente en estas últimas, existen vacuolas de contenido fluido, rodeadas de una membrana. Cuando las vacuolas, plástidos o mitocondrias son aislados de la célula, se expanden o se retraen de acuerdo con los cambios de la presión osmótica, obedeciendo a la ley de Boyle-Mariotte. Este fenómeno depende de la existencia de membranas que regulan los intercambios osmóticos.

Las mitocondrias y los cloroplastos (en las células vegetales) se consideran *organoides* u *organelas* celulares, por la constancia con que se encuentran y la importante función que desempeñan en las células. Otros organoides celulares, como el complejo de Golgi y los centríolos, se observan más raramente en las células vivientes. Por último, hay organoides que están por debajo del poder de resolución del microscopio óptico y no pueden apreciarse en dichas células.

LA CÉLULA FIJADA

Estructura general

Como se mencionó antes, el examen de la célula viviente se halla limitado al microscopio óptico, y se basa principalmente en los diferentes índices de refracción de los distintos componentes. A menudo, el uso de colorantes que actúan en el organismo vivo (*coloración vital*) suele ser una ayuda para superar las dificultades en la observación de la célula viviente. De mayor importancia son los métodos de fijación, por medio de los cuales la muerte de la célula se realiza de manera tal que la estructura y la composición química son conservadas lo más aproximadamente posible a las de la célula viviente (véase cap. 7). El escepticismo acerca de la fijación que comenzó a fines del siglo XIX debido a los trabajos con modelos coloidales (véase cap. 1) ha pasado, y ahora se reconoce que el examen de la célula fijada puede aportar datos de

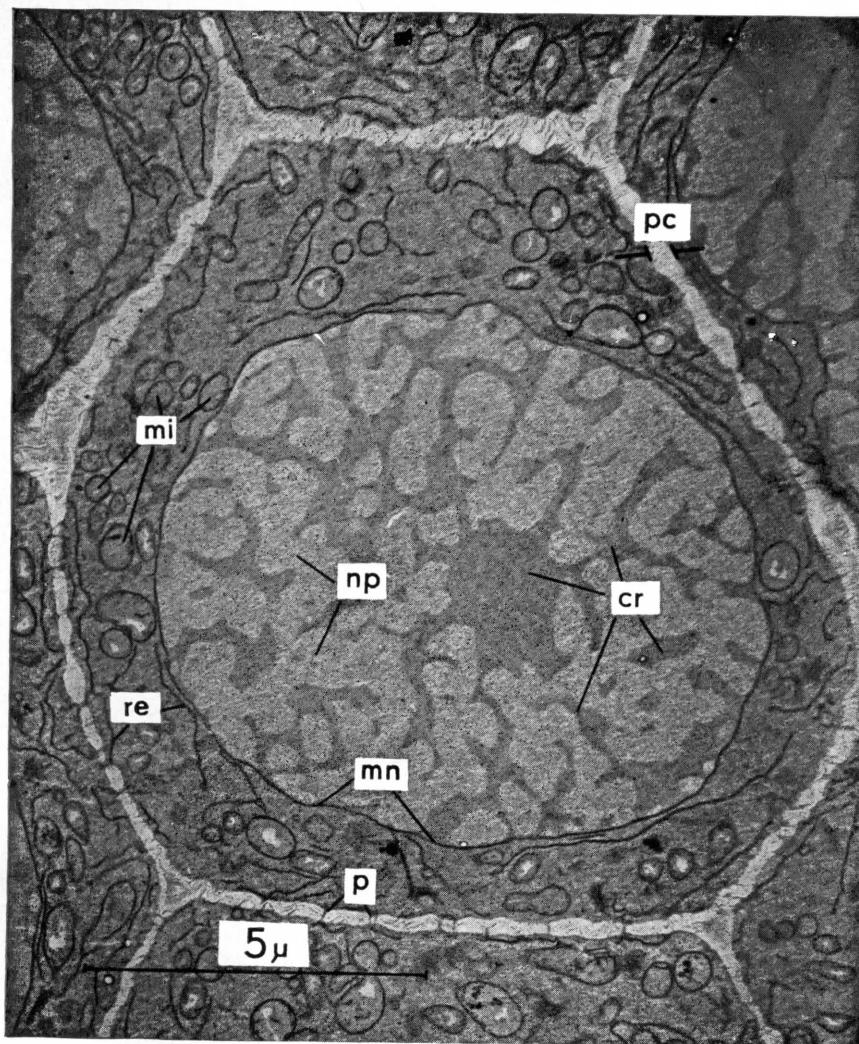


FIG. 2-4. Fotomicrografía de una célula promeristemática de la raíz del ajo (*Allium sativum* L.). Fijación en MnO_4K . El voluminoso núcleo central muestra grumos densos de cromatina (*cr*) y el nucleoplasma interpuesto (*np*). La membrana nuclear (*mn*) y el retículo endoplásmico (*re*) son bien visibles; *mi*, mitocondrias y protoplástidos; *p*, plasmodesmos que atraviesan la pared celular (*pc*). 8800 $\times$. (Cortesía de R. D. Machado y K. R. Porter.)

gran importancia acerca de la estructura celular.

Al describir la morfología general de la célula fijada no haremos más distinción entre lo observado con diferentes instrumentos. Como se mencionó en el capítulo 1, el lector deberá ser capaz de analizar las estructuras en su propio nivel de organización. Tiene que saber que todas las partes examinadas con el microscopio óptico pueden ser vistas más detalladamente con el microscopio electrónico, que además brinda estructuras nuevas y anteriormente desconocidas.

La observación de una célula en los animales o vegetales superiores impresiona por la complejidad de su organización estructural. Estamos muy lejos en la evolución desde la primitiva forma de vida ilustrada en la figura 1-3, pero es interesante también reconocer las similitudes. En la célula eucarionte, la principal disparidad es la existencia de un verdadero núcleo con *membrana nuclear* o *carioteca*, que divide a la célula en dos compartimientos principales: el núcleo y el citoplasma. El citoplasma a su vez está separado del medio por la *membrana plasmática*.

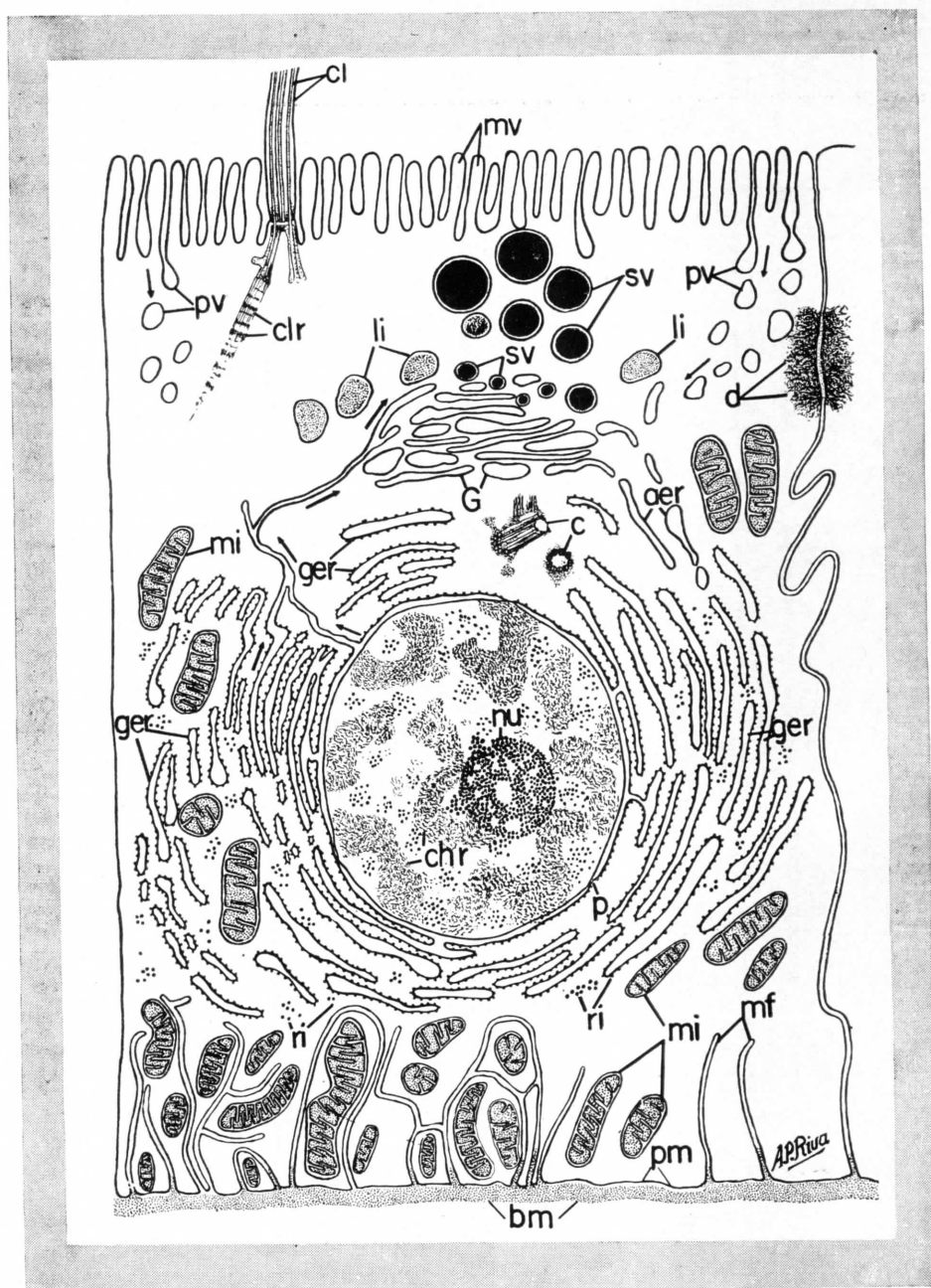


FIG. 2-5. Esquema general de la ultraestructura de una célula animal ideal. aer, Reticulo endoplásmico agranular; bm, membrana basal; c, centriolo; chr, cromosoma; cl, cilio; clr, raíz del cilio; d, desmosoma; g, complejo de Golgi; ger, reticulo endoplásmico granular; li, lisosoma; mf, pliegue de la membrana; mi, mitocondria; mv, microvellosidad; nu, nucléolo; p, poro; pv, vesícula pinocítica; ri, ribosoma, y sv, vesícula de secreción. (De De Robertis y Pellegrino de Iraldi.)

En las células vegetales (fig. 2-4) la membrana plasmática se halla cubierta y protegida exteriormente por una pared celular más gruesa, a través de la cual se encuentran puentes celulares, los *plasmodesmos*, que comunican entre sí células vecinas. En las células animales (fig. 2-5) la membrana plasmática está cubierta en ciertas partes por una fina capa de material, que es descrita generalmente como cubiertas externas de la membrana plasmática. Las denominadas membranas basales de la figura 2-5 corresponden a estas cubiertas externas. En la figura 2-4, el núcleo se encuentra en el estado de no división o interfase, y la *cromatina*, que durante la división constituye los diferentes cromosomas, aparece irregularmente distribuida en grumos o filamentos en el *jugo nuclear* o *cariolinfa* (fig. 2-4), que llena por completo el núcleo. Algunos de los grumos más gruesos de cromatina se denominan *cromocentros* o *cariosomas*. Aparte de estos dos componentes, existen uno o más cuerpos esféricos, los *nucléolos*, que difieren de los cromocentros por ciertas propiedades tintóreas y por su composición química (fig. 2-2).

El compartimiento citoplásmico es el más complejo en organización estructural y será descrito con detalle en distintos capítulos de este libro. Al examinar una célula con el microscopio electrónico, el observador queda sumamente sorprendido por el enorme desarrollo de las membranas. Ellas constituyen la membrana limitante externa, con sus numerosas invaginaciones y diferenciaciones (figura 2-5), y la membrana nuclear. Por añadidura, se encuentra una organización membranosa básica en los organoides celulares, como en los *lisosomas* (fig. 2-5, *li*) y en las *mitocondrias* (fig. 2-5, *mi*), en los cuales una o dos membranas separan su matriz interior del citoplasma fundamental que los rodea. Los *cloroplastos* (véase cap. 12) son organoides con una organización compleja multilaminada. También algunas diferenciaciones de células animales como la membrana de mielina y el segmento externo de los conos y bastones están formadas por compactos sistemas de membranas. Estas rodean asimismo a numerosas vesículas, vacuolas y granos de secreción encontrados en el citoplasma (figura 2-5, *sv*). Además, existe un complejo sistema de membranas, cuyo desarrollo varía en los diferentes tipos celulares y de acuerdo con la diferenciación celu-

lar, que ocupa el citoplasma fundamental formando múltiples compartimientos y subcompartimientos. El sistema es tan polimorfo que resulta difícil describirlo y encuadrarlo en una sola denominación. El término *sistema vacuolar* es, para nosotros, el más general y apropiado con el fin de describir el hecho de que generalmente separa el citoplasma en dos fases: una contenida dentro del sistema, y la otra, o *matriz citoplásmica* propiamente dicha, situada fuera de él. A este sistema vacuolar pertenece el *complejo de Golgi* y la *envoltura nuclear*, pero en su mayor parte está formado por el *retículo endoplásmico*, el cual a su vez debe diferenciarse en una parte de *retículo granulado*, que posee ribosomas adheridos, y otra del *retículo agranulado*. En el esquema de la fig. 2-5 se indican las posibles continuidades e intercomunicaciones funcionales entre las diferentes partes del sistema vacuolar del citoplasma.

Otros organoides celulares son los *centríolos*, que se relacionan con la división celular, en cuyo momento aparece una zona clara y gelificada alrededor, la *centrosfera*, de la que parten radiaciones de citoplasma fibrilar, la *astrosfera*. En este estado de máximo desarrollo el organoide suele también denominarse *centro celular*. Los centríolos se hallan vinculados, asimismo, con la diferenciación de *cilios* y *flagelos*, que son apéndices móviles de la célula (fig. 2-5, *cl*).

Para terminar con la descripción preliminar y sintética de la célula fijada es necesario señalar que, a pesar de toda esta organización estructural compleja, la porción más importante del citoplasma permanece en la *matriz* o *citoplasma fundamental*, situado por fuera del sistema vacuolar. Esta matriz constituye el verdadero medio interno de la célula y contiene los *ribosomas*, que son la parte primordial de la maquinaria biosintética, partículas de glucógeno, enzimas solubles, proteínas estructurales y todos los componentes encontrados en los organismos primitivos, con exclusión del ácido desoxirribonucleico (ADN). Es también el asiento de las propiedades coloidales del protoplasma, y muchas diferenciaciones citoplásmicas, como las fibras de queratina, miofilamentos y microtúbulos, son producidas en dicha matriz. El estudio detallado del sistema vacuolar en sus diferentes partes, de los organoides citoplásmicos y las diferenciaciones de la matriz ci-

toplásmica se realizará en distintos capítulos de este libro, después que el lector haya adquirido las nociones de la organización química de la célula, que son esenciales para realizar un estudio integral de sus diferentes partes estructurales y funcionales.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Brachet, J. and Mirsky, A. E. (eds.): (1959-1961) *The cell*. 6 volumes. Academic Press, New York.
- Chambers, R.: (1924) The physical structure of protoplasm. In: *General Cytology*. University of Chicago Press, Chicago.
- Fischer, A.: (1946) *Biology of tissue cells*. Cambridge University Press, London.
- Gaillard, P. J.: (1953) Growth and differentiation of explanted tissues. *Rev. Cytol.*, 2:331.
- Harvey, E. B.: (1950) *McClung's handbook of microscopical technique*. 3rd ed., Paul B. Hoeber, New York.
- Lima de Faria, A. (ed.): (1969) *Handbook of molecular Cytology*. North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Runnström, L.: (1952) The cytoplasm, its structure and role in metabolism, growth and differentiation. In: *Modern trends in Physiology and Biochemistry*. (Barron, E. S. G., ed.). Academic Press, New York.
- White, P. R.: (1959) The cell as organism, tissue culture, cellular autonomy and cellular interrelations. In: *The cell*, vol. 1, p. 291 (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.). Academic Press, New York.

Introducción general al estudio del núcleo y de los cromosomas

Desde su descubrimiento como elemento constante de la célula (Brown, 1831), los citólogos se interesaron por los extraordinarios cambios que suceden en el núcleo durante el ciclo vital de aquélla.

En el curso de su vida, toda célula pasa esencialmente por dos períodos: uno de *interfase* —o de no división— y otro de *división*, por medio del cual se producen dos células hijas. Este ciclo se repite en cada generación celular, pero el tiempo varía considerablemente de un tipo celular a otro. Como se estudiará en el capítulo 20, existen células que tienen ciclos breves de vida y se dividen muy a menudo, mientras que otras poseen períodos muy largos, tan largos como la vida del organismo (por ejemplo, la célula nerviosa).

Durante este ciclo vital el núcleo pasa por una serie de cambios complejos pero sumamente regulares y constantes, en cuyo transcurso la membrana nuclear y el nucléolo desaparecen y la sustancia cromática se condensa en cuerpos intensamente coloreados: los *cromosomas* (del griego: *chroma*, color; *soma*, cuerpo).

Digamos desde el comienzo que el número de cromosomas es constante para las especies, pero que difieren en su morfología y fisiología. En la interfase generalmente no son visibles porque se encuentran en un estado de dispersión o hidratación muy intensa y sus componentes macromoleculares distribuidos laxamente dentro de la esfera nuclear. Sin embargo, los cromosomas se hallan constantemente en el núcleo.

El estudio del núcleo y de los cromosomas es por cierto el más interesante en Citolo-

gía, como consecuencia de las funciones fundamentales que desempeñan en los fenómenos hereditarios y en el control y regulación de la mayoría de las actividades celulares. En la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) contenida en los cromosomas existe la mayor cantidad de información genética que se trasmite de una célula a otra.

EL NÚCLEO

Morfología, constancia, forma, tamaño, número y posición

En todas las células de animales y vegetales superiores se encuentra un núcleo con los caracteres indicados en el capítulo 2. El denominado *nucleoide* bacteriano fue descrito en el capítulo 1.

La *forma* del núcleo está relacionada a veces con la de la célula, pero puede ser completamente irregular. Si la célula es isodiamétrica (esférica, cúbica, poliédrica), generalmente el núcleo es esférico. Por el contrario, en células cilíndricas, prismáticas y fusiformes tiende a ser elíptico; en las pavimentosas es aplanado. Se encuentran ejemplos de núcleos irregulares en los granulocitos (con forma de herradura o multilobulado), ciertos infusorios (moniliforme), células glandulares de muchos insectos (ramificado) y espermatozoides (elíptico, piriforme, lanceolado, etc., de acuerdo con la especie).

El *tamaño del núcleo*, aunque variable, guarda relación por lo común con el volumen citoplásmico. Esta relación se puede expresar numéricamente por medio del *índice o rela-*

ción nucleoplasmática (N/P) (R. Hertwig):

$$N/P = \frac{V_n}{V_c - V_n}$$

siendo V_n volumen nuclear y V_c volumen celular.

Al reflejar N/P un equilibrio entre los volúmenes nuclear y citoplásmico, cuando aumenta uno también debe aumentar el otro. El desequilibrio de esta relación sería un estímulo para la división celular.

Ya en 1905 Boveri había advertido que en las larvas de erizo de mar el tamaño del núcleo era proporcional al número cromosómico, aumentando de las células haploides a las diploides y de éstas a las tetraploides.

Cuando se observan hepatocitos con el microscopio óptico resulta fácil reconocer algunos núcleos más grandes, que corresponden a células tetraploides u octoploides. El tamaño del núcleo es mínimo cuando la mayor parte de la cromatina está condensada, como en los pequeños linfocitos o en los timocitos, y en este caso se halla en íntima relación con el contenido de ADN. En los ovocitos, el núcleo (*vesícula germinal*) puede alcanzar gran volumen, pero ello está vinculado con el contenido proteico, especialmente en lo que a proteínas ácidas se refiere (véase cap. 17). En general puede decirse que cada núcleo somático tiene un tamaño específico, el cual depende del contenido de ADN y proteínas y se relaciona con la actividad funcional que posee en la interfase.¹

Casi todas las células son *mononucleadas*, pero existen también *binucleadas* (algunas células hepáticas y cartilaginosas) y *polinucleadas* (hasta un centenar en los policariocitos u osteoclastos de la médula ósea. En los plasmodios, que constituyen grandes masas protoplásmicas no subdivididas en territorios celulares, los núcleos son numerosísimos. Tal es el caso de la fibra muscular estriada y el de ciertas algas sifonales.

La *posición* es variable, pero en general es característica y constante para cada tipo celular. En las células embrionarias casi siempre ocupa el centro geométrico, aunque por lo común se desplaza cuando tiene lugar la diferenciación o la formación de sustancias específicas o de reserva. En las células secretoras se sitúa en la parte basal y los gránulos ocupan el citoplasma apical. Cualquiera que sea la posición que adopte el núcleo, en las células diferenciadas está rodeado general-

mente de una zona de citoplasma que mantiene su estructura embrionaria indiferenciada.

Estructura general del núcleo interfásico

En el capítulo anterior, al describir la estructura general de la célula dijimos que, con algunas excepciones, la observación vital o supravital revela sólo la presencia de una membrana nuclear y de uno o más nucléolos. Por el contrario, en el material fijado y coloreado, la estructura del núcleo se distingue por su gran complejidad y varía de acuerdo con el tipo de célula y el fijador empleado (fig. 7-7).

En general podemos distinguir:

1) Una *membrana nuclear* o *carioteca*, que aparece como una línea bien delimitada sobre ambos lados, citoplásmico y nuclear. La membrana nuclear es verdaderamente invisible con el microscopio óptico, pero se la reconoce por la aposición de la cromatina sobre la superficie interna y del citoplasma sobre la externa.

2) Una masa clara incolora o ligeramente acidófila, el *jugo nuclear* o *nucleoplasma*. Este le da al núcleo la turgencia y transparencia que posee cuando se lo examina con el microscopio de fase (figs. 2-2 y 10-6). La parte proteica es la que precipita por acción de ciertos fijadores para formar estructuras fibrilares artificiales denominadas *linina*.

3) Filamentos retorcidos que contienen la *cromatina*, sustancia con propiedades tintóreas características, que se esparce por todo el jugo nuclear. Actualmente se considera a la cromatina como la expresión interfásica de los cromosomas, antes que se organicen y contraigan para la siguiente división celular. Los cromosomas son entidades autónomas que están presentes durante la interfase aunque aparentemente pierdan su individualidad morfológica.

4) Grumos de cromatina, los *cromocentros*, *cariosomas* o nucléolos falsos. Son zonas de cromatina más condensada, también llamadas de *heterocromatina* (véase más adelante), en las cuales partes de los cromosomas permanecen condensadas (espiralizadas). Algunos de estos cromocentros pueden estar adheridos al nucléolo, constituyendo la cromatina asociada al nucléolo.

5) Cuerpos *esféricos* o *nucléolos*, a menudo de tamaño considerable (células nerviosas,

ovocitos, etc.), únicos o múltiples, que se parecen a los cariosomas, pero difieren por su afinidad tintórea, en general acidófila, y por su contenido en ribonucleoproteínas.

Concepto de mitosis y meiosis

Es importante introducir en este momento lo esencial referente a la mitosis y la meiosis, que serán estudiadas con mayores detalles en capítulos posteriores.

Todos los organismos que se reproducen sexualmente se desarrollan a partir de una sola célula, el *cigoto*, originada por la unión de otras dos: las células *germinativas* o *gametos* (el espermatozoide que proviene del macho y el óvulo que procede de la hembra). La unión del óvulo con el espermatozoide se denomina *fecundación*. El cigoto producido por medio de la fecundación desarrollará un nuevo individuo de la misma especie que la de sus padres.

Cada célula del individuo, con excepción de los gametos, contiene idéntico número de cromosomas. En las células somáticas de un vegetal o un animal, los cromosomas se presentan de a pares; en ellas, un miembro de cada par es originario de un progenitor y el otro miembro del otro.

Los miembros de un par de cromosomas se denominan *homólogos* y se habla comúnmente de pares de cromosomas (o de homólogos) para referirse al número de cromosomas de una especie. El hombre posee 46 cromosomas o 23 pares, la cebolla tiene 8 pares, el sapo 11, los mosquitos 3, etc. (tabla 3-1). Los homólogos de cada par son semejantes, pero los pares son generalmente diferentes. El número original de cromosomas de cada célula (número diploide) se preserva durante las sucesivas divisiones nucleares implicadas en el crecimiento y desarrollo de un organismo multicelular.

Mitosis

La continuidad del número cromosómico es mantenida por medio de la *división celular* o *mitosis*. Cuando se produce la división celular, el núcleo experimenta una reorganización completa, la cual se ilustra en el esquema de la figura 3-1. La mitosis comprende una serie consecutiva de fases, conocidas como profase, prometáfase, metafase, anafase y telofase. En las células somáticas los núcleos se dividen por mitosis y de ellos resul-

tan núcleos hijos con el mismo número de cromosomas. Por consiguiente, las células hijas son, en cuanto a su constitución cromosómica, idénticas entre sí y a sus antecesoras.

En la figura 3-1 se representan dos pares de cromosomas homólogos en una célula diploide. Los cromosomas se duplican individualmente durante la interfase. En esta etapa y en la profase temprana, los cromosomas aparecen como filamentos extendidos y delgados. Al final de la *profase*, los cromosomas se convierten en bastones cortos y compactos por un proceso de "espiralización". En la *metafase* se produce un huso entre los dos centriolos y los cromosomas van a colocarse en un solo plano formando la placa ecuatorial de la célula. En la *anafase*, cada cromosoma hijo se separa para ir al correspondiente polo de la célula. Finalmente, en la *telofase* se forman dos núcleos a partir de cada uno de los dos grupos polares de cromosomas hijos.

Meiosis

En la mitosis, el número original de cromosomas persiste durante las sucesivas divisiones nucleares, y puesto que las células somáticas derivan del primitivo cigoto, por medio de mitosis, todas ellas contienen un doble juego o número diploide ($2n$) de cromosomas.

Si los gametos (óvulo y espermatozoide) fueran también diploides, el cigoto resultante tendría el doble del número diploide de cromosomas. Para evitar esto, los gametos experimentan un tipo especial de división celular, denominada *meiosis*, en la cual el número diploide normal se reduce a un juego único o haploide (n) en cada gameto. El cigoto resultante es entonces diploide. El proceso meiótico es característico de todos los vegetales y animales que se reproducen sexualmente y tiene lugar en el curso de la gametogénesis (fig. 3-1). La meiosis consiste en la reducción del número de cromosomas por medio de dos divisiones nucleares que sólo implican una única división de los cromosomas. Estas se conocen como *primera* y *segunda división meiótica*.

La esencia del proceso es simple. Los cromosomas homólogos de cada par, que pueden distinguirse por su morfología idéntica, se aproximan uno al otro para ponerse en íntimo contacto y formar una *tétrada* o *bivalente*. Cada cromosoma se compone de dos cromátidas y por tanto el bivalente posee *cuatro*

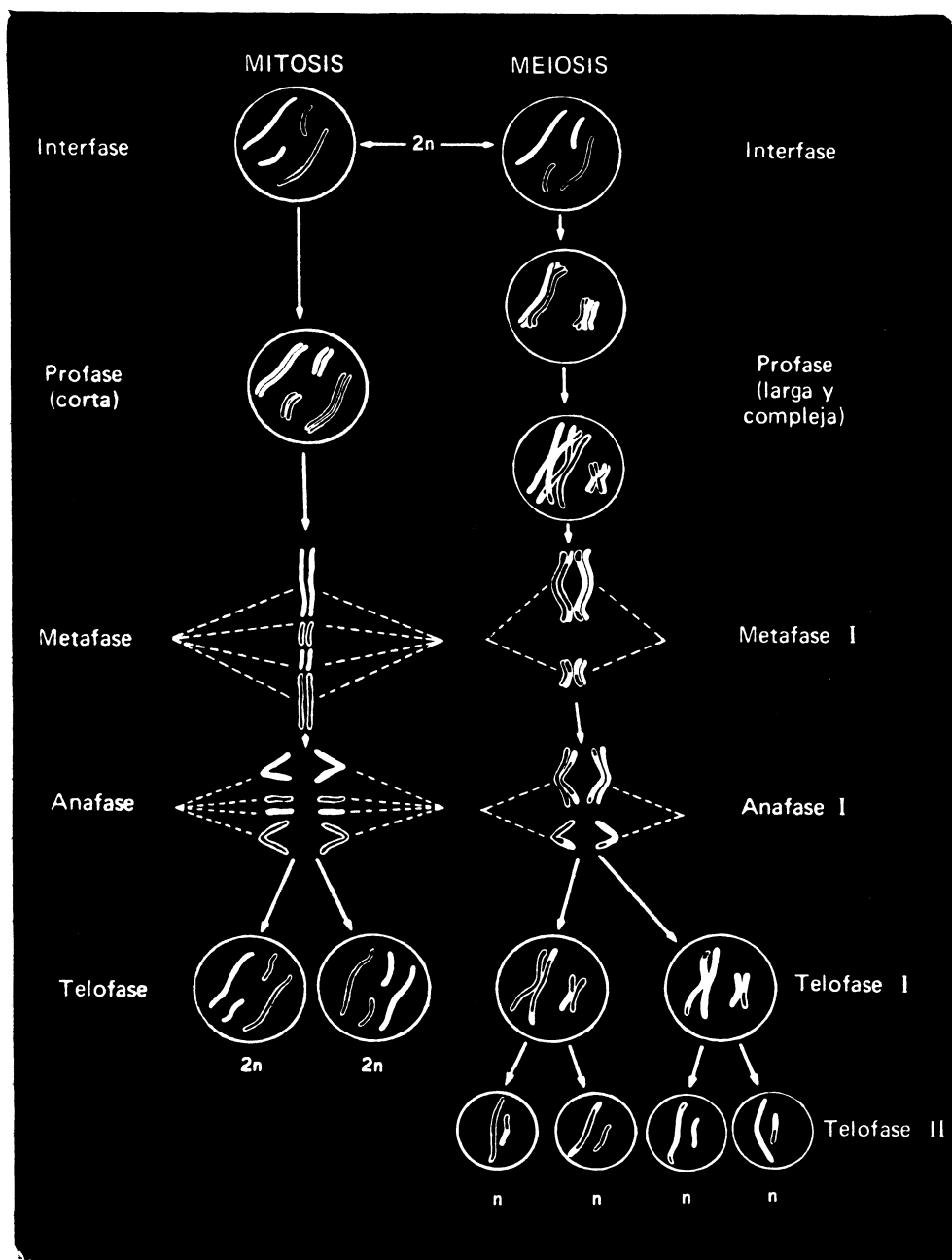


FIG. 3-1. Esquema comparativo de la mitosis y la meiosis de una célula ideal que posee cuatro cromosomas ($2n$). Los cromosomas pertenecientes a cada progenitor están representados en blanco y en negro. En la mitosis, la división es ecuacional, mientras que en la meiosis es reduccional: las dos divisiones dan lugar a cuatro células que tienen sólo dos cromosomas (n). Durante la meiosis existe, además, un intercambio de segmentos entre los cromosomas.

cromátidas. En la tétrada sólo una cromátida del homólogo está apareada. Pueden intercambiarse porciones de estas cromátidas apareadas, de un homólogo al otro, dando lugar a figuras con entrecruzamientos que se denominan *quiasmas*. El quiasma es una manifestación citológica de un fenómeno genético subyacente, el *crossing-over* (véase cap. 14).

En la metafase I, los bivalentes se disponen sobre el huso, y en la anafase I, cada cromosoma homólogo con sus dos cromátidas asociadas van a los polos opuestos. Después de un corto período de intercambio, las dos cromátidas de cada homólogo se separan en la segunda división meiótica, de modo que las cuatro cromátidas ahora están distribuidas en cada uno de los cuatro gametos. Los resultados son cuatro núcleos, cada uno de los cuales tiene un número simple o haploide de cromosomas (fig. 3-1).

En el macho, todas las células se convierten en espermatozoides. En la hembra, una sola célula se transforma en óvulo; las otras tres constituyen los pequeños *glóbulos polares*. En los vegetales, la formación de células germinativas es algo complicada debido a que antes de la fecundación los productos haploides de la meiosis sufren dos o más divisiones mitóticas. Sin embargo, los caracteres esenciales del proceso meiótico son similares tanto en animales como en vegetales.

En *resumen*: en la mitosis ocurre una sola duplicación cromosómica por cada división, mientras que en la meiosis tiene lugar una sola duplicación cromosómica seguida por dos divisiones.

En la mitosis, los cromosomas homólogos se duplican individualmente, pero no se aparean. En la meiosis, los cromosomas homólogos forman pares que luego se agregan en las dos células hijas de la primera división. Durante la segunda división, cada homólogo se escinde en sus cromátidas y forma parte de cada una de las cuatro células resultantes.

CROMOSOMAS

De todos los componentes celulares observados durante la mitosis y la meiosis, los cromosomas son los que más minuciosamente han sido estudiados. Su presencia fue demostrada mucho antes de que Waldeyer los denominara "cromosomas" en 1888. El botánico Hofmeister, cuarenta años antes, estudiando las células maternas del polen de *Tradescantia*, los había dibujado directamente de las

células vivientes. Un cromosoma puede ser considerado como un componente nuclear dotado de organización, individualidad y función especiales. Es capaz de autoduplicarse y de mantener sus propiedades morfológicas y fisiológicas a lo largo de divisiones celulares sucesivas.

Morfología

La morfología de los cromosomas se estudia mejor durante la metafase y en la anafase de la división celular. Entonces aparecen como cuerpos cilíndricos, que se tiñen intensamente con los colorantes básicos y el método de Feulgen (véase cap. 7). Se observan fácilmente *in vivo* con el microscopio de fase (fig. 2-2) y revelan además intensa absorción en el espectro ultravioleta a 2600 Å.

Los cromosomas pueden estudiarse en cortes de tejido, pero más adecuadas son las preparaciones que obtienen todo el conjunto de cromosomas por medio del aplastamiento de una pequeña pieza de tejido. Las glándulas sexuales, los meristemas vegetales, las células madres del polen y otras se comprimen entre el portaobjetos y el cubreobjetos, y simultáneamente se colorean y fijan con los métodos de la hematoxilina acética o el carmín acético.

El empleo de soluciones hipotónicas, antes del aplastamiento, produce hinchazón del núcleo y da como resultado una mejor separación de los cromosomas individuales. Los cromosomas humanos se estudian fácilmente en extendidos de médula ósea, cultivo de leucocitos o de otros tejidos. Estas investigaciones han dado resultados muy importantes desde el punto de vista patológico y citogénico (véase capítulo 15).

Los cromosomas se clasifican en cuatro tipos por la morfología que tienen durante la metafase y anafase. Estos son: I) *telocéntricos*, cromosomas bastoniformes con el centrómero ubicado en su extremo proximal; II) *acrocéntricos*, cromosomas bastoniformes que tienen uno de sus brazos muy pequeño y casi imperceptible (fig. 3-2); III) *submetacéntricos*, cromosomas que tienen brazos desiguales y en forma de L; IV) *metacéntricos*, cromosomas con ambos brazos iguales o casi iguales, y por tanto en forma de V. Los distintos tipos cromosómicos son constantes para cada par de cromosomas homólogos.

A fin de caracterizar un cromosoma en el cariotipo se usan, además de la forma y la

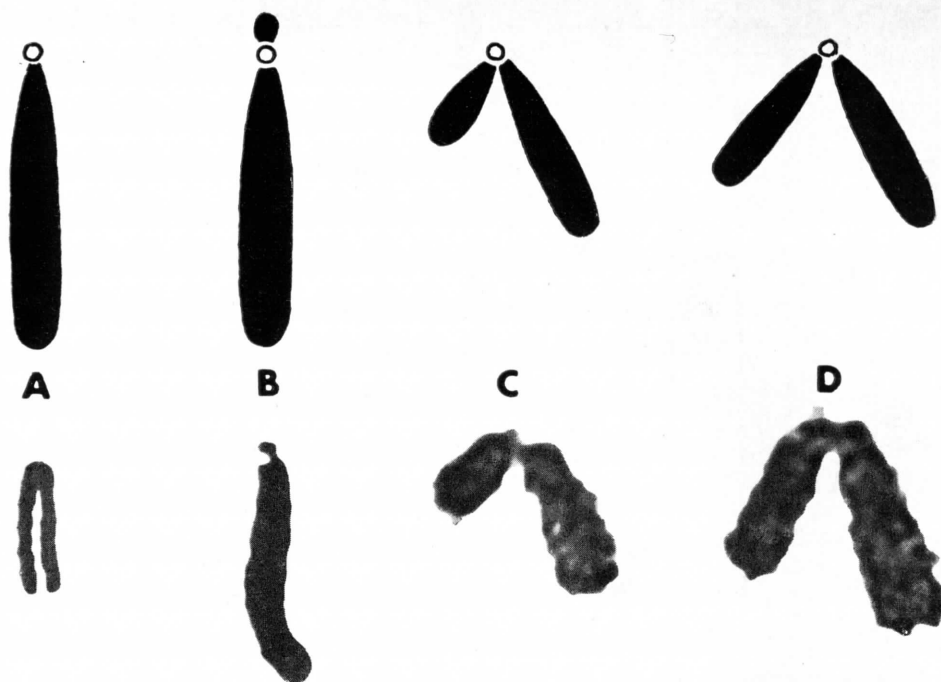


FIG. 3-2. Los cuatro tipos morfológicos de cromosomas de acuerdo con la posición del centrómero. A Telocéntrico. B Acrocéntrico. C Submetacéntrico. D Metacéntrico. En la parte superior de la figura, el esquema, y en la inferior, la fotomicrografía correspondiente de cada tipo.

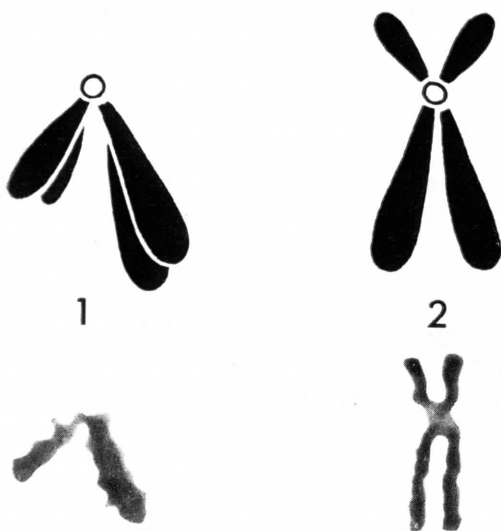


FIG. 3-3. Cambio en la morfología del cromosoma por la influencia de colchicina. 1. Cromosoma submetacéntrico con dos cromátidas. 2. El mismo cromosoma después de ser sometido a la acción de la colchicina: se endereza y sus dos cromátidas se separan. En la parte superior, el esquema, y en la inferior, la fotomicrografía de las dos configuraciones del cromosoma.

longitud total, otros dos parámetros:

a) El *índice centromérico* (*ic*), que es la relación:

$$ic = \frac{\text{Longitud del brazo corto}}{\text{Longitud cromosómica total}}$$

En un cromosoma metacéntrico *ic* equivale a 0.5.

b) La *proporción de los brazos*, determinada por la relación entre el brazo corto y el largo. En un cromosoma estrictamente metacéntrico esta relación es igual a 1.

Debe destacarse que la morfología del cromosoma puede cambiar por la influencia de ciertas drogas. Así, un cromosoma submetacéntrico tratado con colchicina se endereza y sus dos cromátidas se separan (fig. 3-3).

Centrómero. (Del griego: *meros*, parte.) La forma de los cromosomas está determinada por la *constricción primaria* que se localiza en el punto donde se juntan las ramas o brazos (fig. 3-4). Dentro de la constricción hay una zona clara que contiene un pequeño gránulo o esférula. Esta región clara constituye el *centrómero* o *quinetocoro*, relacionado funcionalmente con el movimiento de los cro-

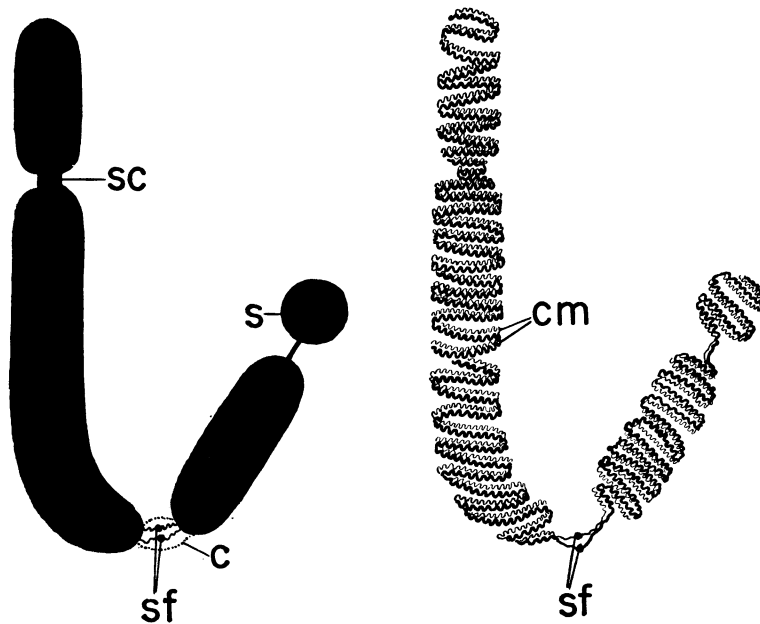


FIG. 3-4. Esquema de la morfología de un cromosoma metacéntrico. Izquierda: Aspecto externo con el satélite (s), las constricciones secundarias (sc), el centrómero (c) y las fibras del huso (sf). Derecha: El mismo cromosoma, pero indicando la estructura interna con los dos cromonemas (cm) y sus espirales mayor y menor.

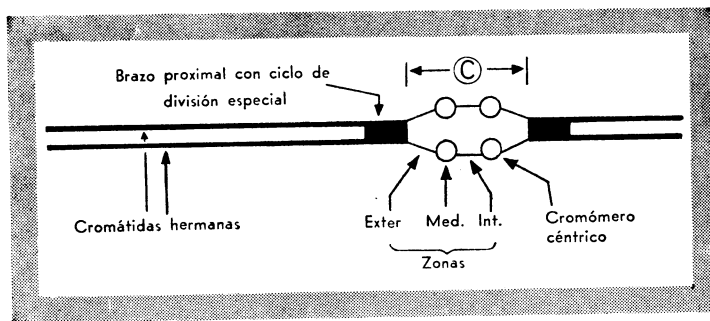


FIG. 3-5. Esquema que representa la organización del centrómero (c). (De acuerdo con Lima de Faría.)

mosomas durante la mitosis. Por algún tiempo se describió al centrómero como el punto de inserción de la fibra del huso. En los cromosomas del *Trillium*, el centrómero tiene un diámetro de $3\ \mu$ y una esférula de $0.2\ \mu$. Generalmente existe un solo centrómero por cromosoma (monocéntrico), sin embargo puede haber también dos (dicéntrico) o más (policéntrico o con el centrómero difuso; por ejemplo: *Ascaris megalocéfala*, insectos hemípteros, etc.).

La estructura del centrómero parece ser más compleja de lo que se pensaba (fig. 3-5).

La zona media mantiene la relación entre el cromosoma y el huso. En el esquema las dos cromátidas hermanas que se forman en cada cromosoma metafásico están unidas por una región que posee un ciclo especial de división.² Se ha demostrado citoquímicamente que el centrómero posee ADN.³

Constricciones secundarias. Otra característica morfológica son las *constricciones secundarias*. Estas, constantes en su posición y tamaño, son muy útiles para la identificación de un cromosoma particular en el con-

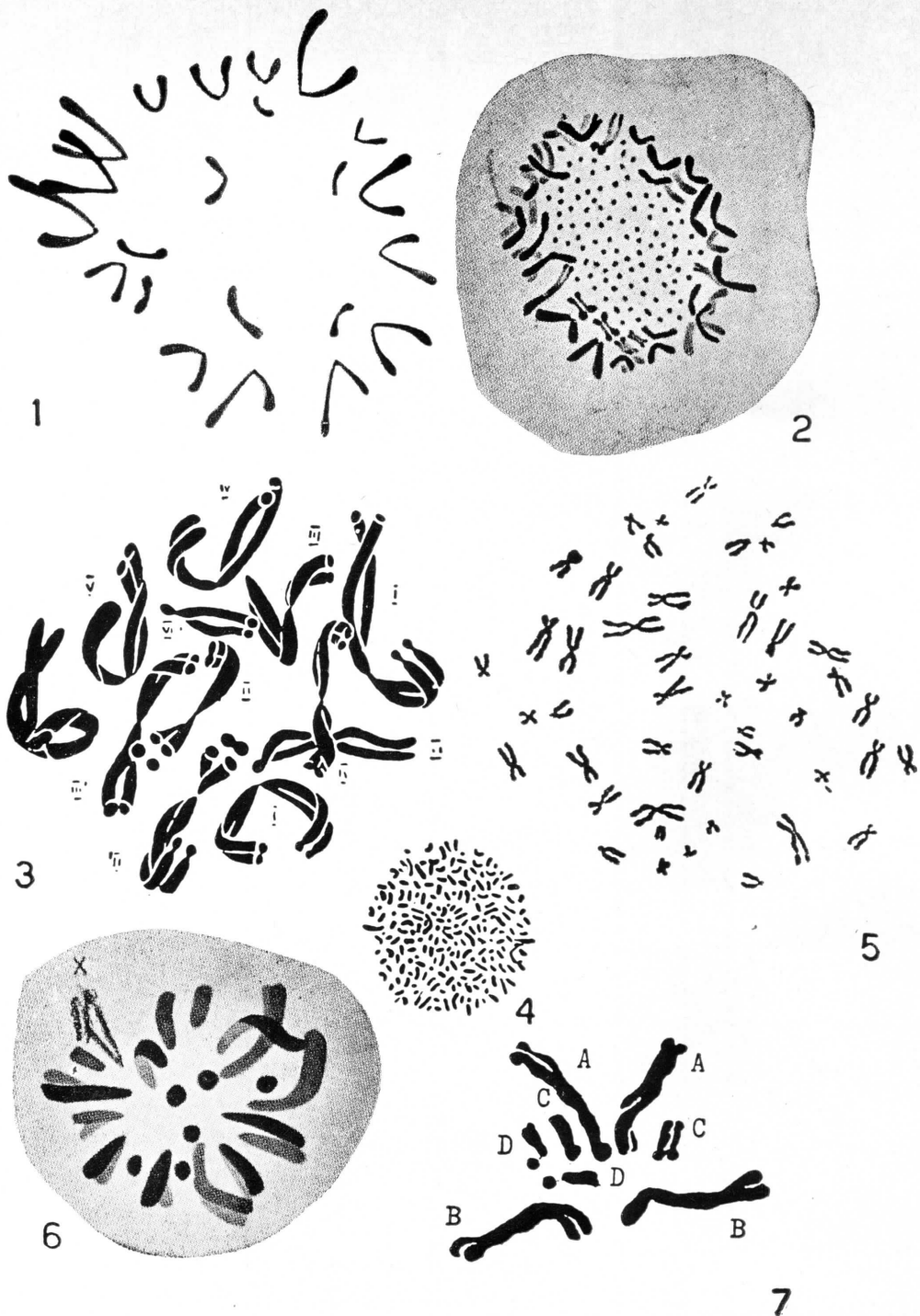


FIG. 3-6. Características de los cromosomas somáticos de algunos vegetales y animales. Todas las figuras corresponden a metafases en vista polar. 1 Los 22 cromosomas del sapo *Bufo arenarum*, en los que se aprecia su morfología; en algunos se distingue un punto correspondiente al centrómero. 2 Los cromosomas del reptil *Tupinambis teguixin*, con sus 140 elementos distribuidos en microsomas en el centro y macrosomas en la periferia. 3 El complejo de cromosomas compuesto de 12 elementos de una ranunculácea, *Nigella orientalis*, en los que pueden verse algunas cromátidas enrolladas entre sí formando la espiral relacional (los números romanos indican las parejas de cromosomas homólogos). 4 Los 208 cromosomas del crustáceo decápodo *Paralithodes camtschatica*, mostrando su morfología bastoniforme y puntiforme. 5 Los 46 cromosomas de la especie humana, 6 Los 23 cromosomas acrocéntricos de la langosta *Chromacris miles* (el cromosoma sexual, indicado por la X, se halla en heteropiconosis negativa). 7 Los 8 cromosomas de la planta compuesta *Hipchoeris Tweedie*, con una pareja de satélites; las letras indican las parejas de cromosomas homólogos. (1. Según Sáez, Rojas y De Robertis; 2, según Mathey; 3, según Lewitsky; 4, según Niyama; 5, original; 6, según Sáez; 7, según Sáez.)

junto. Pueden ser cortas o largas; se distribuyen a lo largo del cromosoma y se distinguen de la constricción primaria por la ausencia de una acentuada desviación angular en los segmentos cromosómicos (fig. 3-4).

Telómeros. (Del griego: *telo*, lejos.) Este término se aplica a las extremidades del cromosoma. Si se fracturan los cromosomas por medio de los rayos X, los segmentos resultantes pueden fusionarse nuevamente. Los telómeros poseen aparentemente una polaridad que impide que los otros segmentos se unan a ellos.

Satélites. Es otro elemento morfológico presente en ciertos cromosomas. Se trata de un cuerpo redondeado, elongado y separado del resto del cromosoma por un delicado filamento cromatínico. Su diámetro puede ser igual al del cromosoma o mucho menor. Del mismo modo, el filamento de unión puede ser corto o largo (fig. 3-4). Es costumbre designar como cromosomas-SAT a aquellos que tienen un satélite. El satélite y el filamento son también constantes en forma y tamaño para cada cromosoma.

Zona nucleolar. Ciertas constricciones secundarias están íntimamente relacionadas con la formación de los nucléolos. Estas zonas especializadas son las *zonas nucleolares* u *organizadores nucleolares*. Comúnmente en cada núcleo existen dos cromosomas, denominados cromosomas nucleolares, que tienen esta característica especial.

Constantes morfológicas de los cromosomas. Cariotipo. Las características más importantes que identifican a los cromosomas individuales durante la mitosis son su número, tamaño relativo, estructura, comportamiento y organización interna. Existen otras características, como el grado de "espiralización" y de contracción lineal, que pueden estar sujetadas a variaciones fisiológicas.

Una de las constantes mejor conocidas es el número de cromosomas (tabla 3-1), y sirve como ayuda para la determinación de la posición filogenética y taxonómica de las especies vegetales y animales. El organismo con el número más pequeño de cromosomas es el nematodo *Ascaris megalocephala univalens*. Posee sólo dos cromosomas somáticos y por tanto $n = 1$.

La *forma* de los cromosomas también ayuda para la identificación de un determinado complejo. Algunas especies tienen cromosomas

que son identificados con facilidad (fig. 3-6), pero en otras es más difícil hacerlo.

La forma de los cromosomas es susceptible de experimentar cambios por acción de agentes químicos o de radiaciones. Más aún, pueden producirse alteraciones espontáneas en la naturaleza aunque resulte difícil determinar su origen y diferenciarlas de alteraciones accidentales (véase cap. 14). Como se mencionó anteriormente, algunos de los criterios empleados para la identificación morfológica se basan en la posición del centrómero, en las constricciones secundarias y en la existencia y localización de los satélites.

TABLA 3-1. Número diploide (2n) de cromosomas en algunos vegetales y animales

VEGETALES

<i>Denominación vulgar y científica</i>	<i>Cromosomas</i>
Pino amarillo, <i>Pinus ponderosa</i>	24
Repollo, <i>Brassica oleracea</i>	18
Rabanito, <i>Raphanus sativus</i>	18
Lino, <i>Linum usitatissimum</i>	30, 32
Ombú, <i>Phytolacca dioica</i>	36
Melón de agua, <i>Citrullus vulgaris</i>	22
Pepino, <i>Cucumis sativus</i>	14
Papaya, <i>Cárlica papaya</i>	18
Algodón, <i>Gossypium hirsutum</i>	52
Cerezo, <i>Prunus cerasus</i>	32
Ciruelo, <i>Prunus domestica</i>	48
Pera, <i>Pyrus communis</i>	34, 51, 68
Maní, <i>Arachis hypogea</i>	40
Ceibo, <i>Erythrina cristagalli</i>	42
Café, <i>Coffea arabica</i>	44
Girasol, <i>Helianthus annuus</i>	34
<i>Luzula purpurea</i>	6
Papa, <i>Solanum tuberosum</i>	48
Tomate, <i>Solanum lycopersicum</i>	24
Tabaco, <i>Nicotiana tabacum</i>	48
<i>Tradescantia virginiana</i>	24
Banana, <i>Musa paradisiaca</i>	22, 44, 55, 77, 88
Arveja, <i>Pisumsativum</i>	14
Frijol, <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Naranja, <i>Citrus sinensis</i>	18, 27, 36
Manzana, <i>Malus silvestris</i>	34, 51
Avena, <i>Avena sativa</i>	42
Maíz, <i>Zea mays</i>	20
Cebada, <i>Hordeum vulgare</i>	14
Trigo de verano, <i>Triticum dicoccum</i> ..	28
Trigo de pan, <i>Triticum vulgare</i>	42
Centeno, <i>Secale cereale</i>	14
Arroz, <i>Oriza sativa</i>	24
<i>Sorghum spp</i>	10, 20, 40
Sorgo negro, <i>Sorgum almun</i>	40
Caña de azúcar, <i>Saccharum officinarum</i>	80
Haba, <i>Vicia faba</i>	12
Cebolla, <i>Allium cepa</i>	16
<i>Eucalyptus spp</i>	22
Pasionaria, <i>Passiflora coerulea</i>	18

TABLA 3-1. Continuación
ANIMALES

<i>Denominación vulgar y científica</i>	<i>Cromosomas</i>
Caracol romano, <i>Helix pomatia</i>	54
Gusano de seda, <i>Bombyx mori</i>	56
Mosca casera, <i>Musca domestica</i>	12
Mosca de vinagre, <i>Drosophila melano-</i> <i>gaster</i>	8
Mariposa española, <i>Lysandra nivescens</i>	380
Saltamontes, numerosos, <i>Acrididae</i>	23, 24
Langosta silvestre, <i>Tetrigidae</i>	13, 14
america)	8
america)	8
Abeja, <i>Apis mellifica</i>	32, 16
Mosquito, <i>Culex pipiens</i>	6
Ranas, <i>Rana spp.</i>	26
Ranas de árbol, <i>Hyla spp.</i>	24
Sapos, <i>Bufo spp.</i>	22
Pollo, <i>Gallus domesticus</i>	ca. 78
Pavo, <i>Meleagris gallopavo</i>	82
Paloma, <i>Columba livia</i>	80
Pato, <i>Anas platyrhyncha</i>	80
Comadreja, <i>Didelphys virginiana</i> (<i>D. pa-</i> <i>raguarensis</i>)	22
Ratón, <i>Mus musculus</i>	40
Conejo, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	44
Rata albina, <i>Rattus norvegicus</i>	42
Rata vulgar, <i>Rattus rattus</i>	42
Hamster amarillo, <i>Mesocricetus auratus</i>	44
Hamster chino, <i>Cricetulus griseus</i>	22
Cobayo, <i>Cavia cobaya</i>	64
Mulita, <i>Dasypus hybridus</i> (sudamericana)	64
Armadillo, <i>Dasypus novemcinctus</i> (nor-	
teamericano)	64
Perro, <i>Canis familiaris</i>	78
Gato, <i>Felis domestica</i>	38
Caballo, <i>Equus caballus</i>	66
Asno, <i>Equus asinus</i>	66
Cerdo, <i>Sus scrofa</i>	40
Oveja, <i>Ovis aries</i>	54
Cabra, <i>Capra hircus</i>	60
Buey, <i>Bos taurus</i>	60
Mono rhesus, <i>Macaca mulatta</i>	42
Gorila, <i>Gorilla gorilla</i>	48
Orangután, <i>Pongo pygmaeus</i>	48
Chimpancé, <i>Pan troglodytes</i>	48
Hombre, <i>Homo sapiens</i>	46

Existen grupos zoológicos que presentan una típica morfología como en la familia de los acrididos (langostas), cuyos cromosomas son generalmente acrocéntricos y en forma de bastón (fig. 3-6, 6), o los anfibios (fig. 3-6, 1) que tienen cromosomas metacéntricos en forma de V. Entre los vegetales, la forma de los cromosomas es más variable, con satélites y constricciones características (fig. 3-6, 3 y 7).

El tamaño de los cromosomas es relativamente constante y permite la individualización de cada uno de los miembros de un complejo. La longitud de un cromosoma puede variar entre 0.2 y 50 μ y el diámetro entre 0.2 y 2 μ . En la especie humana, el tamaño más común de los cromosomas es de 4 a 6 μ .

En un núcleo mitótico, cada homólogo no siempre se encuentra cerca de su compañero, puesto que la localización de cada cromosoma es completamente independiente durante este ciclo. Un cromosoma dado puede ocupar cualquier parte del núcleo.

Se denomina *cariotipo* al grupo de características que se toman en cuenta para identificar un juego cromosómico particular. Es característico del individuo, la especie, el género o de grupos más grandes. El cariotipo se puede representar por un diagrama denominado *idiograma*, en el cual se ordenan los pares de homólogos en series de tamaño decreciente (véase cap. 15).

Cromonema y ciclo del cromonema

La mayoría de los cromosomas no presentan ninguna estructura interna especial examinados con el microscopio óptico durante las etapas compactas de la metafase y anafase (fig. 3-4). Sin embargo, en los estadios menos compactos es posible advertir en su interior la existencia de un filamento espiral. Esta estructura, observada por Baranetsky en 1880 en la célula madre del polen de *Tradescantia*, fue denominada *cromonema* por Vejdovsky en 1912. El cromosoma espiral se patentiza mejor después de tratamientos especiales que comprenden la acción de agentes, como vapores de ácido, agua caliente, soluciones alcalinas y cianuro de potasio, que tienden a separar las espirales. Por medio de dichos recursos ha podido estudiarse el ciclo del cromonema en la mitosis y la meiosis (figs. 3-7 y 3-8). En la figura 3-4 se ha representado la estructura interna de un cromosoma metafásico. El número de filamentos dentro del cromonema suele ser de 2, 4 o más según el material estudiado. El cromonema es simple en un momento del desarrollo y está constituido por dos o cuatro unidades en otros.

Pueden formarse dos tipos de espirales entre dos o más filamentos cromonémicos. En el denominado espiral *paranémico*, las unidades se separan libremente (fig. 3-8, a), mientras que en el espiral *pletonémico* (fig. 3-8, b) se encuentran entrelazados y, si se estiran, se transforman en una espiral *relacional*. Con el microscopio es a veces difícil discriminar estos dos tipos (fig. 3-9). El grado de espiralización varía en los cromosomas meióticos o mitóticos y depende de la longitud de ellos.

Los cromosomas meióticos poseen dos espirales distintas: una espiral *mayor*, con diez a treinta giros, y

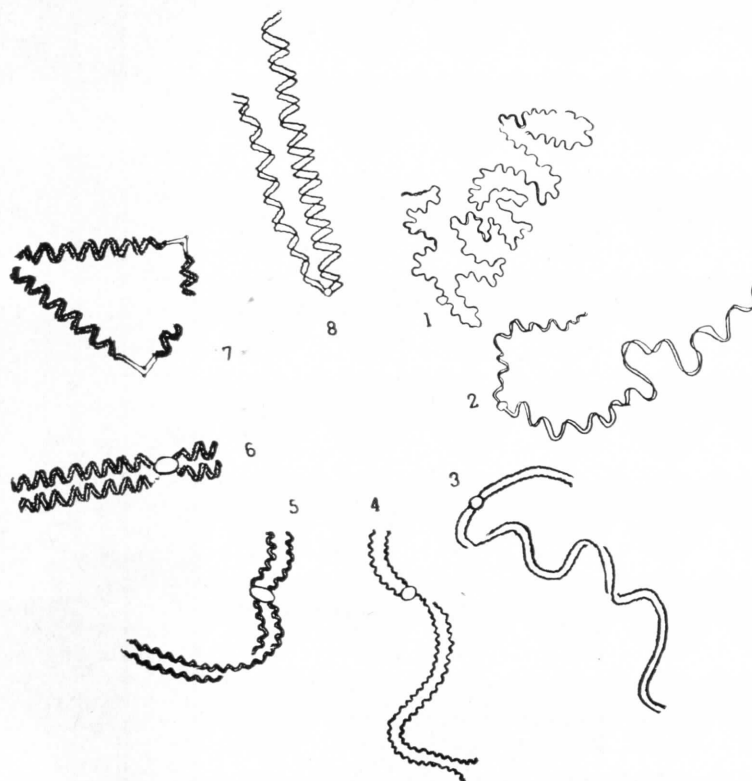


FIG. 3-7. Esquema del ciclo de espiralización del cromonema durante la mitosis. 1 Interfase con la espiral remanente y las superespirales; 2, 3, 4, profase con la espiral remanente; 5, prometafase: cada cromátida con dos cromonemas; 6, metafase: cromonemas con las espirales mayor y menor; 7, anafase; 8, telofase. El centrómero se halla indicado por un círculo.

una espiral *menor*, perpendicular a la primera, y constituida por numerosos giros. Se ha descrito en los cromosomas mitóticos una estructura helicoidal semejante a la espiral mayor, la espiral *standard* o *somática*.

El ciclo de *espiralización del cromonema* es característico tanto de la mitosis como de la meiosis (tablas 3-2 y 3-3).

TABLA 3-2. Largo en micrones y número de giros de las cromátidas de *Trillium grandiflorum* durante la mitosis de los granos de polen (microsporos)

(Según datos tomados de Sparrow, 1942.)

Estadio	Largo de cromátidas	Número de giros
Espiral remanente de 60 giros	450-600	480-600
Profase	346	554
Profase media	202	242
Profase media	205	276
Profase final	173	151
Profase final	154	170
Profase final	142	187
Metafase	77	130
Anafase (15 células, término medio)	95±2.9	130±3.3

Durante la interfase, los cromosomas alcanzan su máxima longitud. Se disponen en forma de zigzag con amplias vueltas que han sido denominadas *superespirales* (fig. 3-7, 1). En la profase cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas enrolladas y entrelazadas. Al final de la profase aparece la espiral somática (fig. 3-7, 2 a 4). El número de giros se reduce y los cromosomas se acortan y au-

TABLA 3-3. Largo de cromosomas y cromonemas en *Trillium erectum* *

Estadio	Largo (en micrones)	
	Cromosomas	Cromonemas
Leptonema	—	920
Cigonema	—	1040
Paquinema	—	640
Diacinesis temprana	86	109
Diacinesis media	125	187
Metafase I	99	320
Anafase I	93	327
Anafase II	76	310

* Según datos tomados de Sparrow, A. H. Huskins, C. L. y Wilson, G. B., 1941, Can. J. Research, C, 19, Tabla I, p. 325.

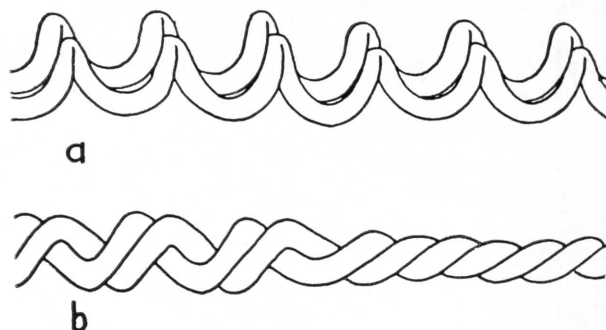


FIG. 3-8. Esquema de los dos tipos de espirales. *a* Paranémico. *b* Plectonémico. En este último si se estira, se produce una espiral relacional entre los dos cromonemas. (De Ris.)

mentan de ancho hasta la metafase, cuando los cromosomas se encuentran en el máximo estado de contracción (fig. 3-7, 6). Siguiendo la anafase, la espiral somática se afloja (fig. 3-7, 7) y durante la siguiente división celular constituirá la espiral remanente.

Euromatina y heterocromatina

En 1928, Heitz definió como “heterocromatina” a las regiones cromosómicas que permanecen condensadas durante la interfase y forman los *cromocentros* o *nucléolos falsos*. Estas contrastan con el resto de la sustancia del cromosoma, que se despiraliza y se hincha durante el mismo período, denominándose “euromatina”. La heterocromatina puede estar en íntimo contacto con el nucléolo, formando alrededor de él una cubierta o anillo que da la reacción de Feulgen positiva (figura 7-7).

Las regiones heterocromáticas son segmentos cromosómicos que en la interfase y profase temprana forman bloques condensados

de cromatina.⁴ La heterocromatina debería ser considerada como un *estado* del cromosoma y no como una sustancia especial.

Durante la mitosis, los segmentos o regiones heteropictóticas pueden teñirse más fuerte o más débilmente que las euromáticas. Este fenómeno ha sido denominado, respectivamente, *heteropictosis positiva* o *negativa* (fig. 3-10). La *heteropictosis* (del griego, *coloración diferente*)² es característica del cromosoma sexual de muchas especies, pero se la observa también en otros cromosomas. La heteropictosis puede estar localizada en los extremos o intercalada a lo largo del cromosoma, y en algunos casos afecta a éste casi por completo. En el sapo *Bufo arenarum* Hensel existe un cromosoma con heteropictosis negativa durante la primera división meiótica (figura 3-10, 2).

Estas regiones heterocromáticas se interpretan morfológicamente como segmentos en los cuales el cromonema posee diferentes estados de espiralización o condensación.⁵⁻⁸ Aun en las zonas densas y uniformes de los cromosomas profásicos e interfásicos se puede comprobar la existencia de un cromonema espiralizado por medio de agentes que desespiralizan, como el cianuro.⁹ Por tanto, el cromonema parece ser continuo desde las regiones euromáticas hasta las regiones heterocromáticas. El microscopio electrónico revela asimismo que las regiones heterocromáticas corresponden a sitios donde la condensación de las microfibrillas es diferente.

Como se mencionará en el capítulo 17, el uso de timidina- H^3 y la autorradiografía permitieron demostrar que, por regla general, las regiones heterocromáticas del cromosoma se duplican más tarde que las euromáticas.¹⁰ Otra propiedad interesante de la heterocromatina se pone de manifiesto administrando actinomicina D- H^3 , un inhibidor de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) dirigida por el ADN. Se demostró por autorradiografía que este antibiótico se une preferentemente a todas las regiones condensadas de la cromatina.¹¹

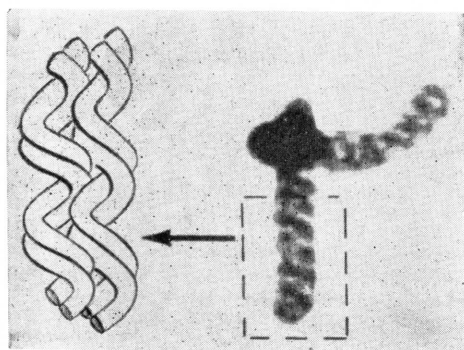


FIG. 3-9. Disposición paranémica-plectonémica de las cromátidas en un cromosoma de trigo en diacinesis. (De G. B. Wilson, A. H. Sparrow y V. Pond.)

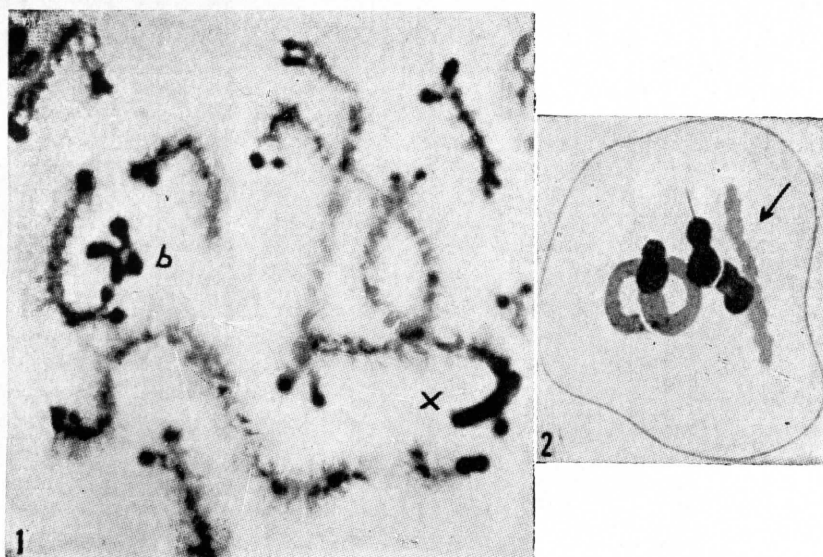


FIG. 3-10. 1 Heteropiknosis positiva de dos cromosomas durante el diploténico, en el ortóptero *Laplatacris* sp. El cromosoma sexual está indicado por una x y el bivalente heterocromático por una b. 2 Heteropiknosis negativa de un bivalente durante la primera división meiótica (metafase 1) en el sapo *Bufo arenarum*. (1, Sáez, 1951, no publicado; 2, Sáez, Rojas y De Robertis, 1936.)

Cromómeros

Otra estructura relacionada con el cromonema es el *cromómero*. En los finos cromosomas de las profases meiótica y mitótica, el cromonema puede mostrar regiones más estrechas alternadas con otras gruesas. El aspecto general es el de un collar con las cuentas dispuestas a lo largo del cromosoma. Las estructuras engrosadas se denominan *cromómeros* y la región entre ellas *intercromómeros*. La posición de cada cromómero es relativamente constante para un cromosoma dado.

La interpretación morfológica de los cromómeros difiere según los autores. Mientras algunos piensan que son condensaciones de material nucleoproteico, otros sostienen que se trata de regiones en las cuales se produce una superposición de espirales. Este último concepto está reforzado por algunas observaciones con el microscopio electrónico de cromosomas leptonémicos, que revelan que las cadenas de los cromosomas se encuentran plegadas en el interior de los cromómeros. El microscopio electrónico ha permitido descartar definitivamente dos conceptos morfológicos: el de la matriz amorfa entre las vueltas de la espiral y el de la película que se creía que rodeaba a cada cromosoma.^{9, 12}

Cromosomas gigantes

En algunas células, y particularmente en ciertas etapas de su ciclo vital, se observan tipos especiales de cromosomas gigantes, caracterizados por un enorme tamaño que trae aparejado el correspondiente aumento de volumen del núcleo y de la célula. A estos tipos especiales pertenecen los *cromosomas politénicos* encontrados en larvas de dípteros, especialmente en las glándulas salivales, y los *cromosomas plumulados*, que se observan en ovocitos de diferentes vertebrados e invertebrados.

En los últimos años el interés por dichos cromosomas aumentó en forma considerable debido a que diversas investigaciones citológicas y citoquímicas indican posibles sitios de actividad genética en ellos (véase cap. 20).

Cromosomas politénicos

En tejidos de insectos dípteros, como por ejemplo en las glándulas salivales, intestino, tráquea, células adiposas, túbulos de Malpighi, etcétera, es posible hallar algunos cromosomas que difieren notoriamente de los somáticos.

Observados por vez primera por Balbiani en 1881, recibieron muy poca atención hasta

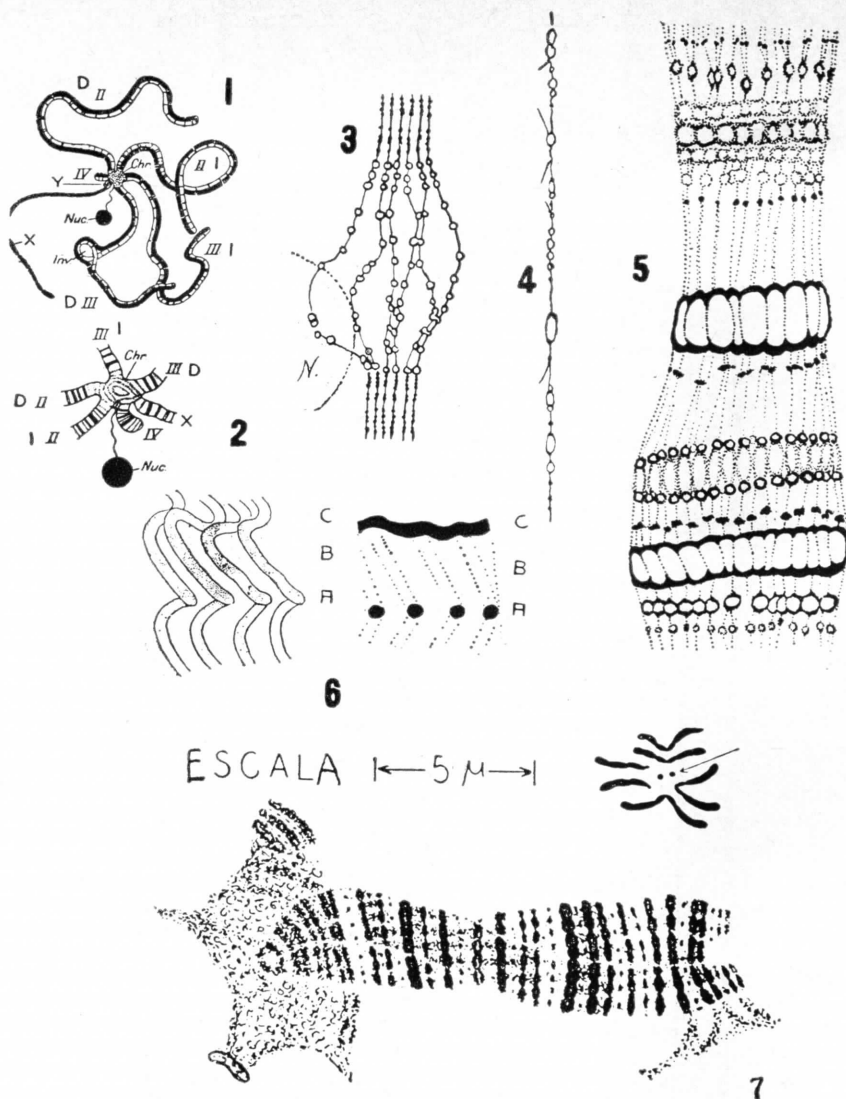


FIG. 3-11. Estructura de los cromosomas politénicos. 1 Aspecto general esquemático de los cromosomas de la glándula salival de un macho de *Drosophila melanogaster*, después de haberse extendido por aplastamiento del núcleo. El cromosoma paterno (en blanco) y el materno (en negro), apareados. Nuc, nucléolo; Chr, cromocentro; X e Y, cromosomas sexuales; D_{II} e I_{II} brazos derecho e izquierdo del II cromosoma; D_{III} e I_{III} brazos derecho e izquierdo del tercer cromosoma; IV, cuarto cromosoma; inv, inversión en el brazo del tercer cromosoma. 2 Cromocentro (chr) formado por la unión de las partes inertes (heterocromáticas) de todos los cromosomas en una hembra de *D. melanogaster*. 3 Región heterocromática del cromosoma X de *Drosophila pseudoobscura*, mostrando sus relaciones en el nucléolo (N) y la constitución filamentosa (cromonémica) del cromosoma. 4 Detalle de un cromonema del cromosoma politénico en el que se ven los diferentes cromómeros. 5 Estructura esquemática del cromosoma de *Simulium virgatum*, mostrando la organización de los cromonemas, cromómeros y vesículas que en conjunto dan el aspecto de bandas. 6 Esquema para ilustrar la interpretación del cromonema helicoidal con falsos cromómeros producidos por las vueltas de la espiral. B Zona con cuatro cromonemas, comprendida entre dos bandas consecutivas (izquierda) y aspecto presentado por la misma región, observada en un plano de enfoque distinto, resultando en A el aspecto granular, como si fuesen cromómeros y en C el de una línea sólida continua (derecha). (1 y 2, según White, 1942; 3, según Bauer, 1936; 4, según Painter y Griffen, 1937; 5, según Painter, 1944; 6, según Ris y Crouse, 1945.) 7. El cuarto cromosoma politénico de *Drosophila melanogaster*, adherido al cromocentro situado a la izquierda. Arriba, derecha, cromosomas somáticos de la misma mosca como se presentan en la mitosis. Obsérvese la diferencia de tamaño entre el cromosoma IV gigante y el IV somático indicado por la flecha y dibujados con el mismo aumento. (Según Bridges, 1935.)

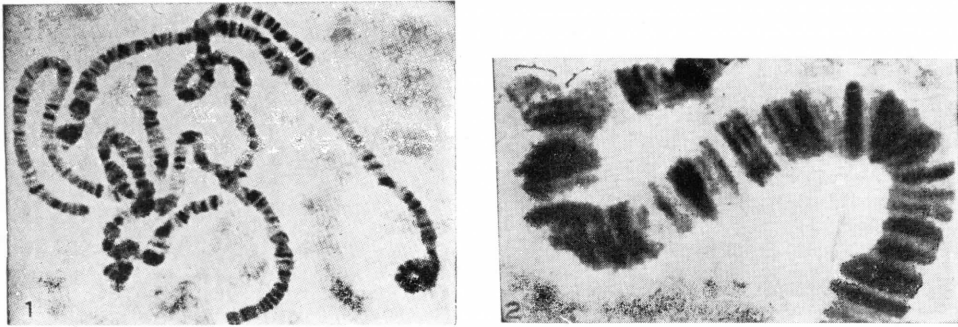


FIG. 3-12. 1 Cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster*. 2 Parte del cromosoma X de la misma mosca observado en luz ultravioleta a 2600 Å. (1, según Sáez; 2, según Schultz, 1941.)

1930, cuando su importancia citogenética fue demostrada por Kostoff, Painter, Heitz y Bauer.

En la *Drosophila melanogaster*, el volumen es unas 1000 veces mayor que en los cromosomas somáticos. La longitud total de los cuatro pares equivale a 2000 micras, en oposición a los 7.5μ en las células somáticas. En la figura 3-11, 7 se indica en aumentos el conjunto cromosómico somático comparado con la pareja más pequeña (IV) de los cromosomas gigantes. Permítasenos decir desde el principio que este enorme tamaño se alcanza por medio de una serie de 9 a 10 ciclos consecutivos de duplicación de los cromosomas, que aumentan en 1000 veces el contenido de ADN.¹³ Otra característica de los cromosomas politénicos es que los pares de homólogos se encuentran íntimamente asociados como ocurre en la profase meiótica (véase cap. 13). Este fenómeno se denomina también *apareamiento somático* y los cromosomas son considerados como si estuvieran en una profase permanente (fig. 3-11, 1).

A lo largo del cromosoma hay una serie de *bandas* oscuras que alternan con otras zonas más claras denominadas *interbandas* (figura 3-12). Las bandas oscuras se tiñen intensamente, dan positiva la reacción de Feulgen y absorben la luz ultravioleta a 2600 Å. Estas bandas pueden ser consideradas como discos que ocupan todo el diámetro de los cromosomas. Las más grandes poseen una estructura más complicada y a menudo forman *doble-tes*. Las *interbandas* tienen aspecto fibrilar, no se colorean con los colorantes básicos, dan negativa la reacción de Feulgen y absorben muy poca luz ultravioleta. Es notable la constancia en el número, localización y distribu-

ción de los discos o bandas en los dos cromosomas homólogos (apareados). Resulta fácil construir, a partir de un cromosoma gigante, mapas topográficos de las bandas e interbandas, relacionarlos con el mapa genético (véase cap. 14) y verificar cualquier alteración o desarreglo en el ordenamiento de su estructura lineal. En los cuatro cromosomas de la *Drosophila* se encuentran más de 5000 bandas. Se han realizado mapas detallados de cada uno de los cromosomas de ésta y de otras especies, en los cuales se registraron minuciosamente las características genéticas de cada una de las bandas y de las regiones intermedias.

La evidencia de que los cromosomas son politénicos (es decir, multifilamentosos) parece ser concluyente. La constitución y diámetro peculiares de estos cromosomas se deben a su formación a partir de un número de fibras (cuatro al comienzo por cada cromosoma) que se multiplican numerosas veces, quedando todas ellas unidas entre sí como los hilos de una soga (fig. 3-11). Cada fibra es muy delicada y difícil de percibir y puede ser considerada como un cromonema.

Este proceso de duplicación de los filamentos se denomina *endomitosis* (véase capítulo 14). Probablemente se producen nueve duplicaciones, lo que da como resultado unas 1000 fibras (fig. 3-11). La longitud del cromosoma politénico es más o menos la de un cromosoma mitótico durante la profase. Algunos autores suponen que los cromonemas se encuentran estirados sin espiralización. Además de estas observaciones acerca del desarrollo de los cromosomas gigantes, la constitución politénica se demuestra morfológicamente por el hecho de que ciertas regiones pueden subdividirse en numerosas subunidades. De acuerdo con esta opinión, las bandas están compuestas por la asociación de cromómeros divididos lado a lado.^{14, 15}

En el capítulo 20 se estudiará la formación de *puff* y anillos de Balbiani en cromosomas politénicos.

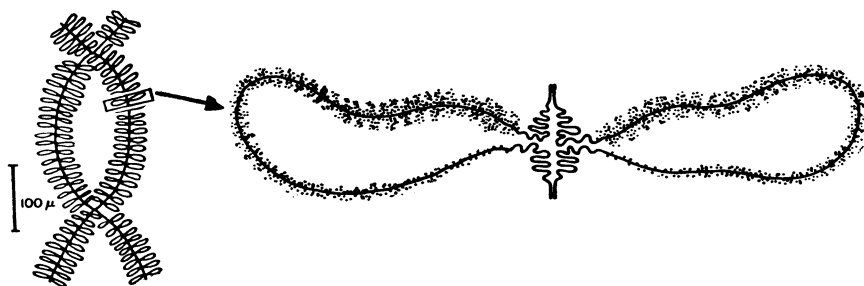


FIG. 3-13. Esquema de los cromosomas plumulados de los ovocitos de *Triturus*. *Izquierda*: Vista con pequeño aumento. En el cuadro se observa un cromómero con las expansiones laterales en forma de asa. *Derecha*: Con mayor aumento, detalle de la estructura de las asas y la espiralización del cromonema. (De Gall, 1956.)

Cromosomas plumulados

Aunque fueron descubiertos por Ruckert en 1892, sólo recientemente se ha llegado a una interpretación adecuada de estos cromosomas. Son aún más largos que los cromosomas politénicos y se encuentran en ovocitos durante el extenso período diploténico de la primera división meiótica. En general, esta fase corresponde al período de máxima síntesis durante la cual se produce el vitelo.

El mayor tamaño se observa en algunos ovocitos de urodelos, en donde el conjunto cromosómico total puede tener 5900 micron, es decir, tres veces más que los politénicos.^{16, 17}

El crecimiento de los cromosomas plumulados resulta del aumento en tamaño del cromonema. Los cromosomas tienen numerosas proyecciones laterales que le dan el aspecto de un cepillo para limpiar tubos de ensayo o de cepillos de lámparas. Es probable que el eje central de estos cromosomas esté constituido al menos por cuatro cromátidas, a las cuales se unen las finas proyecciones laterales. Cada cromosoma bivalente se halla compuesto por dos homólogos unidos entre sí por "puntos de contacto" o quiasmas (cap. 14). El eje está constituido por una hilera de gránulos (cromómeros) y las proyecciones laterales tienen forma de asa (fig. 3-13) y se disponen de a pares.

Existe actualmente acuerdo general en que las asas representan porciones laterales extendidas de las cromátidas (medio cromosoma). Cada asa está cubierta de material proteico y ARN.¹⁷ Los cromómeros en el eje son regiones en las cuales existe una alta espiralización del cromonema (véase fig. 3-3).⁹ Mientras que el eje con sus cromómeros es Feulgen positivo, las asas contienen principalmente ARN y proteínas.

El significado de los cromosomas plumulados y politénicos será considerado nuevamente en el capítulo 17.¹⁸

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Hamerton, J. L. (ed.): (1963) *Chromosomes in medicine*. Medical advisory committee of the National Spastics Society in association with Wm. Heinemann. Little Club Clinics in Developmental Medicine, N° 5.
- Hughes, A.: (1952) *The mitotic cycle*. Academic Press, New York.
- Lewis, K. R. and John, B.: (1963) *Chromosome marker*. J. & A. Churchill, London.
- Mathey, R.: (1949) *Les chromosomes des vertébrés*. L. Rouge, Lausanne.
- White, M. J. D.: (1961) *The chromosomes*. 5th ed. Methuen & Co., London.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Scheiber, G.: (1968) *Int. Symp. Nuclear Physiology and Differentiation*. Belo Horizonte, Brasil. Dec. 1-6, 1968.
2. Lima-de-Faria, A.: (1956) *Hereditas*, 42:85
3. Lima-de-Faria, A.: (1958) *Int. Rev. Cytol.*, 7: 123.
4. Oestergren, G.: (1950) *Hereditas*, 36:511.
5. Darlington, C. D. and La Cour, L.: (1938) *Ann. Bot.*, 2:615.
6. Sparrow, A. H., Moses, M. J. and Dubow, R. J.: (1952) *Exp. Cell Res.*, Suppl. 2:245.
7. Bendich, A.: (1952) *Exp. Cell Res.*, Suppl. 2:182.
8. Schultz, J.: (1947) *Cold Spring Harbor*, 12:179.
9. Ris, H.: (1957) *Chromosome structure*. In: *The chemical basis of heredity*. McElroy, W. D. and Glass, B. (eds.). Johns Hopkins Press, Baltimore.
10. Lima-de-Faria, A. and Jawoska, H.: (1968) *Nature*, 217:138.
11. Simard, R.: (1967) *J. cell Biol.*, 35:716.
12. De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:785.
13. Kurnick, N. B. and Herskovitz, I.: (1952) *J. cell comp. Physiol.*, 39:281.
14. Bauer, H. and Beermann, W.: (1952) *Chromosoma*, 4:630.
15. Mechelke, M.: (1952) *Chromosoma*, 5:246.
16. Duryee, W. R.: (1950) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 50:920.
17. Gall, J. G.: (1956) *Brookhaven Symp. Biol.*, 8:17.
18. Gall, J. G. and Callan, H. G.: (1962) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 48:562.

SEGUNDA PARTE

COMPONENTES MOLECULARES Y METABOLISMO DE LA CELULA

La organización general de la célula, expuesta en forma elemental en los capítulos de introducción, sólo puede ser interpretada sobre bases químicas y fisicoquímicas. El lector deberá repasar los conocimientos de química orgánica y bioquímica adquiridos con anterioridad, especialmente los que se refieren a las proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos.

Esta parte del libro está dedicada al estudio somero de esos componentes moleculares, destacando de manera particular las características esteroquímicas, como la conformación primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, y el modelo de Watson-Crick del ácido desoxirribonucleico, que permite explicar la duplicación y las características especiales por las cuales esta molécula constituye la principal depositaria de la información genética. El capítulo 4 es también esencial para comprender los métodos citoquímicos que se estudian en el capítulo 7.

El capítulo 5 introduce en forma sumaria el concepto de enzimas como maquinarias moleculares utilizadas por la célula para efectuar las transformaciones químicas. La noción de sitio activo y de su posible interpretación en el nivel molecular es de particular importancia. Lo mismo que el conocimiento de la cinética enzimática y de los distintos factores y mecanismos por los cuales la reacción puede inhibirse o activarse. También se incorporan nociones sobre los caminos metabólicos que utiliza la célula para extraer la energía química contenida en los alimentos, la que luego ha de emplearse en la síntesis de nuevos productos que forman su propia masa o que son vertidos al medio externo. Ello implica la inclusión de conceptos sobre las transformaciones energéticas y las uniones de alta energía, así como nociones de bioenergética, entre las cuales se discute el concepto de entropía y su importancia desde el punto de vista biológico. También se informa al lector con respecto a los procesos de oxidación y reducción, fermentación, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, que en conjunto constituyen la respiración celular. Dichos conocimientos son fundamentales para comprender el capítulo 11, referente a las mitocondrias, y el capítulo 12, que reseña el papel de los cloroplastos y el mecanismo de la fotosíntesis.

4

Componentes químicos de la célula

Se dijo en el capítulo 1 que con el objeto de comprender la organización de los sistemas biológicos debe comenzarse por conocer sus principales moléculas constitutivas, especialmente aquellas de alto peso molecular como las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos.

La célula se ha comparado con un minúsculo laboratorio, capaz de llevar a cabo la síntesis y descomposición de numerosas sustancias a la temperatura normal del cuerpo. Como se verá en el capítulo siguiente, estas reacciones químicas se efectúan por medio de la intervención de *enzimas*, que son catalizadores biológicos susceptibles de acelerar las diferentes reacciones químicas. Desde el comienzo diremos que las enzimas son proteínas o contienen proteínas especiales y que pueden compararse a máquinas moleculares capaces de realizar de la manera más eficiente todo tipo de transformaciones químicas (véase cap. 5).

POBLACIÓN MOLECULAR DE LA CÉLULA

Al principio, el estudio de la composición química de la célula se hizo por análisis bioquímico de órganos o tejidos enteros, como el hígado, cerebro, piel o un meristema vegetal. Tales estudios sólo poseen un valor citológico relativo, porque el material analizado está compuesto generalmente por una mezcla de diferentes tipos celulares y también contiene material extracelular.

En los últimos años, el desarrollo de métodos de fraccionamiento celular y de diversos micrométodos (véase cap. 7) permitió aislar diferentes elementos subcelulares, recogiendo una información más importante y pre-

cisa sobre la estructura molecular de la célula.

Los componentes químicos de la célula se clasifican en *inorgánicos* (agua y iones minerales) y *orgánicos* (proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, lípidos, etc). Algunos componentes orgánicos provistos de actividades específicas, como las enzimas, coenzimas, vitaminas y hormonas que se tratarán en el capítulo 5, son estudiados más detalladamente en los tratados de Bioquímica.

El protoplasma de una célula vegetal o animal contiene 75-85 por ciento de agua, 10-12 por ciento de proteínas, 2-3 por ciento de lípidos, 1 por ciento de hidratos de carbono y 1 por ciento de material inorgánico. Aunque el componente más abundante es el agua, los de mayor importancia desde el punto de vista estructural están dados por las proteínas y otras sustancias de gran peso molecular, que pueden constituir macromoléculas o complejos moleculares.

La tabla 4-1 da una idea de las cantidades relativas de los principales componentes orgánicos e inorgánicos que se encuentran en el protoplasma activo. Al mismo tiempo, se estima en forma aproximada el número relativo de moléculas usando porcentajes definidos y los pesos moleculares promedios para los diferentes compuestos. Si bien estas cifras son sólo aproximadas, proporcionan un cuadro interesante de la población molecular relativa que puede existir en el protoplasma.

Se han atribuido pesos moleculares arbitrarios para el ADN, el ARN y las proteínas. De hecho, el peso molecular del ADN de la *Escherichia coli* es de 2.5×10^9 Daltons y corresponde a una molécula por cromosoma (fig. 1-3).

En la tabla 4-1 se indica el número de otras moléculas respecto de una de ADN. Por ejemplo, existen 44 de ARN, 700 de proteínas y 7000 de lípidos por cada molécula de ADN.

TABLA 4-1. Número relativo de moléculas de diversos tipos de materiales celulares

Sustancia	Porcentaje	Peso molecular relativo	Número de moléculas relativas a las de ADN
Agua	85	18	1.2×10^7
Proteínas	10	36.000	7×10^2
ADN	0.4	10^6	1
ARN	0.7	4.0×10^4	4.4×10^1
Lípidos	2	700	7×10^3
Otros compuestos orgánicos	0.4	250	4×10^3
Compuestos orgánicos	1.5	55	6.8×10^4

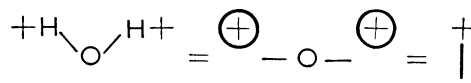
Datos obtenidos de Sponsler y Bath, salvo aquellos sobre ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN), tomados de Euler y Hahan.

Agua, libre o ligada

El agua, con sólo unas pocas excepciones, por ejemplo hueso y diente, es el componente que se encuentra en mayor cantidad. Sirve como solvente natural para los iones minerales y otras sustancias, y también como medio de dispersión para la estructura coloidal del protoplasma. Por ejemplo, se sabe por experimentos de microinyección que el agua se mezcla fácilmente con el protoplasma. El agua es indispensable para la actividad metabólica, ya que los procesos fisiológicos se producen exclusivamente en un medio acuoso. Las moléculas de agua también participan en muchas reacciones enzimáticas de la célula y pueden formarse como resultado de procesos metabólicos.

El contenido en agua de la célula puede considerarse como formado por una fracción *libre* y otra *ligada*. El *agua libre* representa el 95 por ciento del agua total y es la parte usada principalmente como solvente para los solutos y como medio dispersante del sistema coloidal del protoplasma. El *agua ligada* representa sólo el 4-5 por ciento, y es la que está unida laxamente a la proteína por uniones de hidrógeno (véase más adelante) y otras fuerzas. Esta incluye el *agua inmobi-*

zada contenida dentro de las estructuras fibrosas de las macromoléculas. Como resultado de la distribución asimétrica de las cargas, una molécula de agua actúa como un *dipolo*, según se advierte en el esquema siguiente:



Debido a esta propiedad, el agua puede adherirse electrostáticamente por los grupos positivos y negativos a las proteínas. Así, cada grupo amino de una molécula de proteína es capaz de unirse a 2.6 moléculas de agua.

Además, el agua interviene en la eliminación de sustancias de la célula y en la absorción de calor —en virtud de su alto coeficiente calórico—, evitando de este modo cambios drásticos de temperatura en la célula.

El contenido en agua de un organismo está en relación con la edad y con la actividad metabólica; es mayor en el embrión (90-95 por ciento) y disminuye progresivamente en el adulto. También varía en los diferentes tejidos en relación con el metabolismo.

Sales y iones

Las sales disociadas en aniones (por ejemplo, Cl^- y cationes (Na^+ y K^+) son importantes para mantener: a) la *presión osmótica* y b) el *equilibrio ácido-base* de la célula. La retención de iones produce un aumento en la presión osmótica y por tanto la entrada de agua.

Algunos de los iones inorgánicos, el magnesio por ejemplo, son indispensables como cofactores enzimáticos. Otros, como el fosfato inorgánico, forman a través de la fosforilación oxidativa adenosintrifosfato (ATP), principal fuente de la energía química de los procesos vitales celulares. La concentración de los diversos iones varía dentro de la célula y en el líquido que la rodea (véase tabla 21-1). Así, la célula posee una alta concentración de K^+ y Mg^{++} , mientras que el Na^+ y el Cl^- se encuentran localizados principalmente en el líquido intercelular. El anión dominante de las células es el fosfato, pero existe también bicarbonato.

Los *iones de calcio* se hallan en la sangre circulante y en las células. En el hueso se combinan con

los iones fosfato y carbonato en disposición cristalina.

El *fosfato* se presenta en la sangre y en los líquidos tisulares como ión libre, pero gran cantidad de fosfato del cuerpo está unido en forma de fosfolípidos, nucleótidos, fosfoproteínas y azúcares fosforilados. Como fosfato primario (PO_4H^-) y como fosfato secundario ($\text{PO}_4=$) contribuye al mecanismo *buffer* estabilizador del pH de la sangre y de los líquidos intercelulares. Otros iones que existen en los tejidos son el sulfato, carbonato, bicarbonato, magnesio y los aminoácidos.

Ciertos componentes minerales se encuentran en forma no ionizada. Tal ocurre con el *hierro*, unido por uniones metal-carbón, en la hemoglobina, ferritina, citocromos y también en ciertas enzimas. Vestigios de manganeso, cobre, cobalto, yodo, selenio, níquel y molibdeno son indispensables para mantener la actividad celular normal.

Macromoléculas, monómeros y polímeros

Las propiedades estructurales de la célula están íntimamente relacionadas con las largas moléculas compuestas por unidades repetidas, que se enlazan mediante uniones covalentes. Estas unidades se llaman *monómeros* y la macromolécula resultante *polímero*. Es importante destacar que cuando aumentan los monómeros, la molécula adquiere diferentes características. Por ejemplo, los hidrocarburos metano y etano son gases, mientras que el butano y el octano son líquidos; al aumentar la polimerización (20 o más monómeros) se obtienen los aceites y, finalmente, sólidos como las parafinas.

Los tres ejemplos principales de polímeros en Biología son:

1) Ácidos *nucleicos*, que resultan de la repetición de cuatro unidades diferentes denominadas nucleótidos. A su vez, la repetición de los cuatro nucleótidos es la fuente primaria de información biológica, como se explicará en detalle en el capítulo 19 sobre Genética molecular.

2) *Polisacáridos*, que pueden ser polímeros de monosacáridos, formando almidón, amilosa o glucógeno, o pueden implicar también la repetición de otras moléculas, constituyendo polisacáridos más complejos (véase más adelante).

3) Las *proteínas* y *polipéptidos*, que resultan de la asociación de 20 aminoácidos diferentes por uniones peptídicas. En la molécula proteica, el orden de estos 20 monómeros da lugar a una cantidad innumerable de moléculas diferentes, determinando así su especificidad y en ciertos casos la actividad biológica.

Aminoácidos y proteínas

Se ha dicho que las unidades que constituyen las proteínas son los 20 aminoácidos diferentes que el lector deberá recordar de sus estudios de Bioquímica (tabla 4-2). Esencialmente, un aminoácido deriva de un ácido orgánico en el cual un hidrógeno es reemplazado por un grupo amino- NH_2 . Así, el ácido acético da lugar a la *glicina* o *glicocola*.

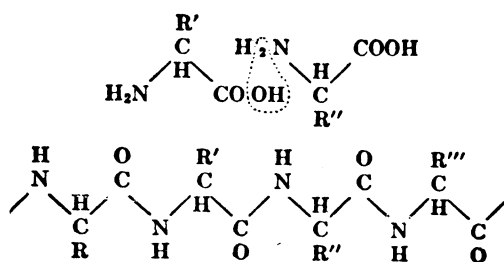
TABLA 4-2. Tipos de aminoácidos naturales y abreviaturas empleadas para ellos

Monoaminomonocarboxílicos
Glicina (Gli)
Alanina (Ala)
Valina (Val)
Leucina (Leu)
Isoleucina (Ileu)
Monoaminodicarboxílicos
Glutámico (Glu)
Aspártico (Asp)
Diaminomonocarboxílicos
Arginina (Arg)
Lisina (Lis)
Hidroxilisina (Hlis)
Con radicales hidroxilo
Treonina (Tr)
Serina (Ser)
Con radicales azufre
Cistina (Cis o Ci-s)
Metionina (Met)
Aromáticos
Fenilalanina (Fe)
Tirosina (Tir)
Heterocíclicos
Triptófano (Trip)
Prolina (Pro)
Hidroxiprolina (Hpro)

y el ácido propiónico a la *alanina*. Debido a la presencia de los radicales carboxilo ($-\text{COOH}$), ácido, y amino ($-\text{NH}_2$), básico, esta molécula se llama anfótera.

Los aminoácidos libres en la célula pueden resultar de la hidrólisis de proteínas o de la absorción a partir del medio. Estos constituyen el llamado *pool de aminoácidos*, a partir de los cuales la célula obtiene las unidades para la síntesis de nuevas proteínas. La condensación de aminoácidos para formar una molécula proteica se produce de tal modo que el grupo ácido de un aminoácido se combina con el grupo básico del adyacente, con

la pérdida simultánea de una molécula de agua:



En esta cadena, R', R'', etcétera, representan los radicales de aminoácidos diferentes. La unión R-NH-CO-R se conoce como *unión peptídica* o *punto peptídico*. La molécula formada mantiene su carácter anfotérico, ya que siempre existe un grupo ácido en un extremo y uno básico en el otro, además de los residuos laterales que son básicos o ácidos (tabla 4-2). Una combinación de dos aminoácidos constituye un *dipéptido*; de tres, un *tripéptido*; cuando se unen entre sí unos pocos aminoácidos, el compuesto es un *oligopéptido*.

La distancia entre dos uniones peptídicas es de 3.5 Å aproximadamente. Una proteína con peso molecular de 30,000 está constituida por 300 residuos de aminoácidos y tiene, extendida, una longitud de 1000 Å, un ancho de 10 Å y un espesor de 4.6 Å. La tabla 4-3 es una lista de pesos moleculares de diversas proteínas.

TABLA 4-3. Pesos moleculares de algunas proteínas

Insulina	12,000
Citocromo (corazón de caballo)	12,100
Tripsina	23,800
Pepsina	35,500
Ovoalbúmina	43,800
Hemoglobina (humana)	67,000
Albúmina sérica (humana)	65,000
γ-Globulina (humana)	100,000
Catalasa	250,000
Colágeno	345,000
Tiroglobulina (cerdo)	650,000

El término *proteína* (del griego: *proteuo*, yo ocupo el primer lugar) indica que todas las funciones básicas en Biología dependen de proteínas específicas. Se puede decir que no existe vida sin proteínas. Están presentes en cada célula y en cada organoide celular. Constituyen las enzimas, la maquinaria contráctil de la célula y se encuentran en la sangre

y en otros líquidos intercelulares. Algunas, en largas cadenas, como el *colágeno* y la *elastina*, desempeñan un papel importante en la organización de los tejidos constituyendo un retículo extracelular.

Para la clasificación de las proteínas, el lector consultará los tratados de Bioquímica. Las propiedades de las proteínas varían considerablemente. La queratina y el colágeno son insolubles y fibrosos, mientras que las *proteínas globulares*, como la albúmina del huevo y las proteínas sanguíneas, son solubles en agua o en soluciones salinas y sus moléculas tienen forma más bien esférica.

Existen también *proteínas conjugadas* que están unidas a porciones no proteicas o *grupo prostético*. A tal categoría pertenecen las *nucleoproteínas*, asociadas con los ácidos nucleicos, las *glucoproteínas* (en las cuales el grupo prostético puede ser el condroitinsulfato), *lipoproteínas* (por ejemplo, lipoproteínas sanguíneas) y *cromoproteínas*, con un pigmento como grupo prostético (hemoglobina, hemocianina, citocromos). En la hemoglobina y mioglobina (presente en el músculo) el grupo prostético es el *hem*, compuesto orgánico que contiene hierro y que se combina con el O₂.

Estructura primaria de las proteínas. Se reconoce como *estructura primaria* de la proteína a la secuencia de los diferentes aminoácidos a lo largo de una cadena polipeptídica, la cual es la más importante y específica, y hasta cierto punto determina las llamadas estructuras *secundaria* y *terciaria*. Agregados de varias cadenas constituyen las estructuras *cua-*
ternarias.

La secuencia de aminoácidos ha sido posible determinarla mediante el desarrollo de una serie de métodos para la degradación de proteínas, que finalmente proporcionaron el primer análisis completo de la *insulina* (Sanger, 1954). Esta molécula está compuesta por dos cadenas, la cadena A, constituida por 21 aminoácidos, y la cadena B, por 30. Ambas cadenas se hallan conectadas por dos uniones -S-S-. En la figura 4-1 se indica la secuencia total de aminoácidos en la *ribonucleasa*, una proteína que tiene 124 aminoácidos. Otras proteínas cuyas estructuras fueron dilucidadas son la hemoglobina, el citocromo C, la lisozima y el tripsinógeno (Dayhoff y Eck, 1968).

En la molécula de proteína, los aminoácidos se ordenan como las cuentas de un collar (fig. 4-1), y esta disposición posee gran importancia biológica. Tal es el caso de las pro-

adyacentes están unidas por uniones de hidrógeno (véase más adelante) formándose una "red peptídica".

2) La *estructura en α -hélice*, que se encuentra en la α -queratina y tiene lugar cuando la cadena polipeptídica se enrolla alrededor de un cilindro imaginario, de modo que las uniones de hidrógeno se establecen dentro de la misma molécula y no con las vecinas (figura 4-4, B).

3) En el grupo del colágeno se ha propuesto un modelo constituido por tres cadenas helicoidales (figura 8-1).

Estructura terciaria de las proteínas. En las *proteínas globulares*, la cadena polipeptídica se mantiene unida en forma muy precisa para constituir una estructura compacta (figura 4-4, C). La disposición espacial de esa cadena es muy compleja, según lo demuestran los estudios con difracción de rayos X (figura 6-10). La disposición espacial se halla predeterminada por la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) y por las uniones que pueden establecerse entre ciertos residuos. Algunas propiedades biológicas de las proteínas están relacionadas con la estructura terciaria (por ejemplo, actividad enzimática, antigenicidad).

La *desnaturalización* de una proteína, obtenida por altas temperaturas u otras condiciones artificiales, consiste en la desorganización

de la estructura terciaria, que generalmente se acompaña de la pérdida de la actividad biológica. Algunas veces, la proteína desnaturalizada puede reasumir su configuración nativa (renaturalización) y, por ende, su actividad.

Estructura cuaternaria de las proteínas y el principio de autoagregación. A diferencia de las estructuras primaria, secundaria y terciaria, que poseen una cadena polipeptídica aislada, en la estructura cuaternaria intervienen dos o más cadenas (fig. 4-4, D), iguales o diferentes, pero que en ambos casos se hallan unidas por uniones débiles, de tipo no covalente. Por ejemplo, la hemoglobina está compuesta de cuatro polipéptidos o subunidades, 2α y 2β , cuya separación y asociación es susceptible de ocurrir espontáneamente. La molécula de hemoglobina puede disociarse por acción de la urea en dos mitadas (dos cadenas α y dos β). Cuando se retira la urea del medio, aquéllas se reúnen constituyendo de nuevo la molécula completa, funcionante. Esta unión es altamente específica y sólo se lleva a cabo entre las dos hemimoléculas. El principio de autoagregación también tiene lugar en la construcción de estructuras celulares más complejas como

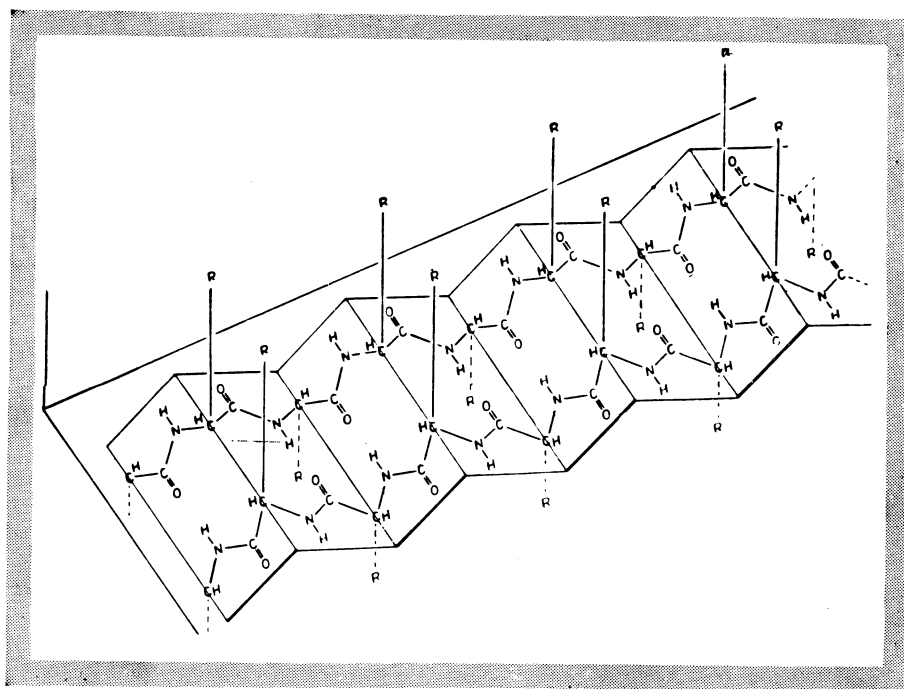


FIG. 4-3. Estructura en hoja plegada de las cadenas de β -proteína. (Véase la descripción en el texto.) (De P. Karlson.)

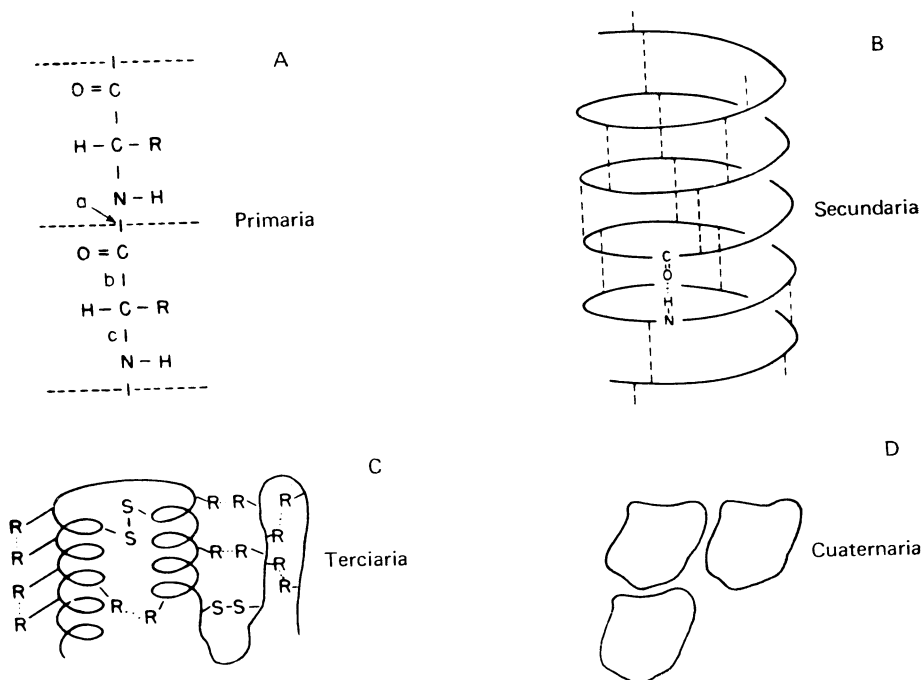


FIG. 4-4. Representación esquemática de la estructura de las proteínas en los distintos niveles. Las cadenas de aminoácidos están indicadas por R y las uniones no covalentes por ... (Cortesía de G. Nemethy, 1967.)

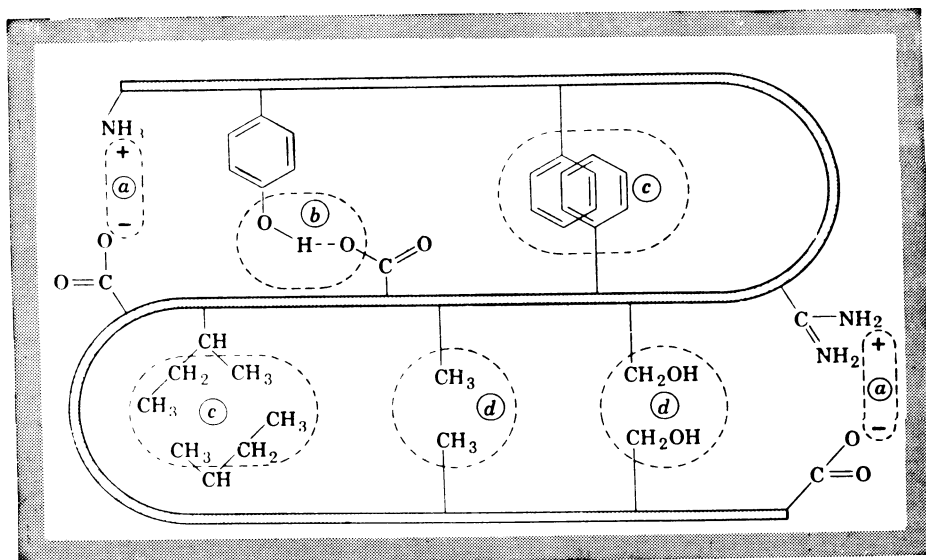


FIG. 4-5. Tipo de uniones no covalentes que estabilizan la estructura proteica. (Véase la descripción en el texto.) (De C. B. Anfinsen, 1959.)

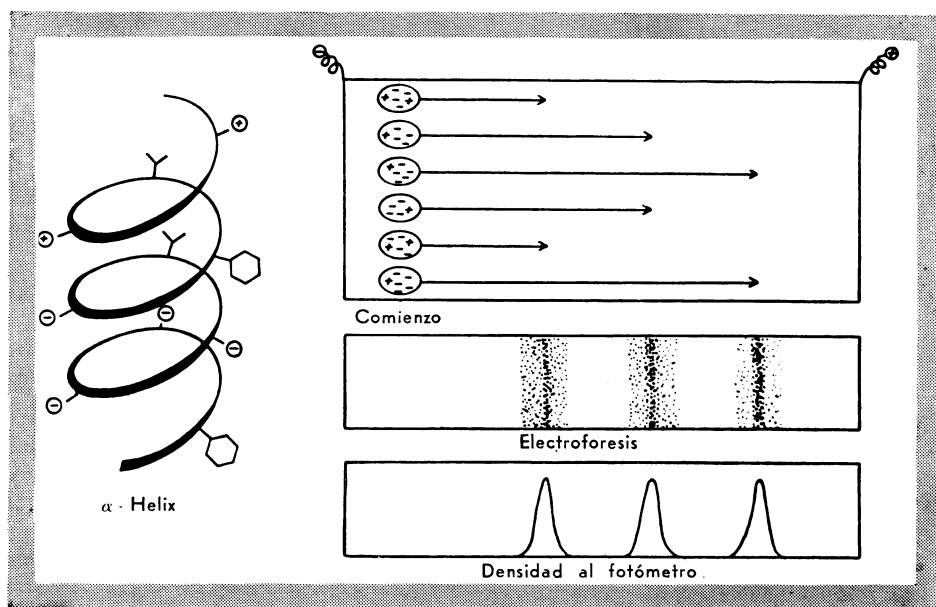


FIG. 4-6. Representación esquemática de la electroforesis. A la izquierda, un segmento de un α -hélice que muestra la localización de ciertos grupos cargados. A la derecha, tres proteínas emigran durante un período de tiempo determinado (por ejemplo, 15 horas) hasta donde indica la flecha. El resultado se hace visible al colorear y evaluar cuantitativamente por fotometría a las proteínas. (De P. Karlson.)

las membranas celulares, microtúbulos, etcétera, en las cuales puede intervenir más de una especie molecular (lípidos y proteínas). Muchas enzimas y otras proteínas, con un PM superior a los 50,000 Daltons, existen probablemente como estructuras cuaternarias. Un ejemplo es el de la aldolasa (PM: 150,000), que a pH bajo se disocia en subunidades de 50,000 Daltons, las cuales vuelven a combinarse en un medio neutro.

Uniones en la molécula proteica. En la estructura de las proteínas participan diferentes tipos de uniones. La estructura primaria (unión peptídica) está completamente determinada por las uniones químicas o covalentes. Se pueden establecer uniones $-S-S-$ de la misma naturaleza entre residuos de cistina, como en el caso de la insulina y de la ribonucleasa (figura 4-1). Las estructuras secundarias y terciarias están determinadas por una serie de uniones más débiles (figura 4-5). Éstas se clasifican en:

1) **Iónicas o electrostáticas**, que unen iones positivos y negativos en la distancia breve de 2.3 Å (figura 4-5, a).

2) **Uniones de hidrógeno**, más débiles que las uniones iónicas y con una distancia mayor (entre 2.5 y 3.2 Å). Son uniones esencialmente electrostáticas que forman un tipo de puente entre dos átomos fuertemente negativos (por ejemplo C, N y O; fig. 4-5 b).

3) **Uniones más débiles y producidas por la interacción de cadenas laterales no polares** y por la mutua repulsión del solvente (fig. 4-5 c).

4) **Fuerzas de van der Waal** producidas por la interacción entre cadenas laterales polares (figura 4-5, d).

Cargas eléctricas de las proteínas. Se ha mencionado más arriba que todos los aminoácidos son anfotéricos o *zwitterions*, es decir, que tienen grupos cargados tanto positiva como negativamente ($-NH_2$ y $-COOH$). Puesto que estos grupos se emplean en las uniones péptidas, sólo los grupos terminales $-COOH$ y $-NH_2$ podrían persistir si no fuera por la presencia de aminoácidos dicarboxílicos y diamínicos (tabla 4-2). Estos residuos especiales de aminoácidos se disocian de la siguiente manera:

1) Los grupos ácidos pueden perder protones y cargarse negativamente. Este tipo se encuentra en los aminoácidos dicarboxílicos, como el ácido aspártico y glutámico, en los cuales el grupo carboxilo libre se disocia en $-COO^- + H^+$.

2) Grupos básicos, que por ganancia de protones se cargan positivamente $-NH_2 + H^+$.

Este tipo se encuentra en los aminoácidos con dos grupos dibásicos, como lisina y arginina, en los que los grupos amino libres pueden ionizarse con cargas positivas. Todos estos grupos, llamados *ionogénicos*, junto con los grupos libres terminales, contribuyen a las reacciones ácido-base de las proteínas y a las propiedades eléctricas de estas moléculas. La figura 4-6 muestra una α -hélice con diversos tipos de cargas en las cadenas laterales, además de otros residuos no cargados.

La carga real de una molécula proteica es el resultado de la suma de todas las cargas de los residuos laterales. Debido a que la disociación de los diferentes grupos ácidos y básicos se produce a dife-

rentes concentraciones de iones hidrógeno del medio, el pH influye en gran medida sobre la carga total de la molécula. En un medio ácido, los grupos amino capturan H^+ y se comportan como bases ($-NH_2 + H^+ \rightarrow -NH_3^+$), mientras que en uno alcalino se produce el fenómeno inverso y se disocian los grupos carboxílicos ($-COOH \rightarrow COO^- + H^+$).

Existe un pH definido para cada proteína, en el cual la suma de las cargas positivas y negativas es cero. Este pH se denomina punto isoelectrónico (pI). En el punto isoelectrónico las proteínas colocadas en un campo eléctrico no emigran a ninguno de los dos polos, mientras que a pH más bajo se desplazan hacia el cátodo y a pH más alto lo hacen hacia el ánodo, llamándose el conjunto de estos movimientos *electroforesis* (fig. 4-6). Muchas propiedades fisicoquímicas se modifican en el punto isoelectrónico; por ejemplo, la viscosidad, solubilidad, hidratación, presión osmótica y conductividad se encuentran en su mínima expresión.

Cada proteína posee un punto isoelectrónico característico. En el caso de las histonas y protaminas, que se localizan principalmente en el núcleo, el punto isoelectrónico es muy alto (pH 10 a 12) y ello se debe a la presencia

de numerosos aminoácidos diamino-monocarboxílicos. El punto isoelectrónico de la gelatina es de 4.7 debido al predominio de aminoácidos monoamino-dicarboxílicos.

Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono, compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, representan las fuentes de energía para las células animales y vegetales. En muchos vegetales son también constituyentes importantes de las paredes celulares y sirven como elementos de sostén. Los vegetales poseen capacidad de sintetizar gran variedad de hidratos de carbono, directamente del anhídrido carbónico y agua, en presencia de luz. En los tejidos animales existen menos carbohidratos, siendo los más importantes la glucosa, la galactosa, el glucógeno y los azúcares aaminados y sus polímeros.

Los carbohidratos de importancia biológica se dividen en: monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los dos primeros grupos, que se conocen comúnmente como azúcares, son solubles en agua, pueden cristalizar y pasan fácilmente a través de las membranas de diá-

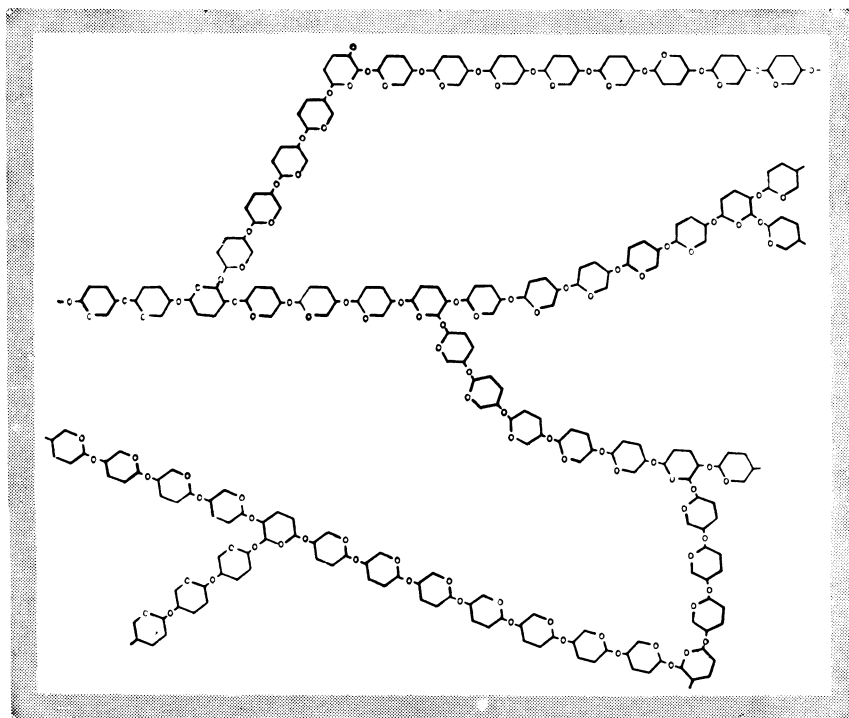


FIG. 4-7. Representación molecular de parte de una macromolécula de glucógeno o de amilopectina. (De J. L. Oncley.)

lisis. Los polisacáridos, por el contrario, no cristalizan y no atraviesan las membranas.

Los *monosacáridos* son azúcares simples con una fórmula empírica $C_n (H_2O)_n$. Se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono en: triosas, pentosas, hexosas y heptosas. Los más importantes en las células son las pentosas y hexosas. Las pentosas *ribosa* y *desoxirribosa* se encuentran en las moléculas de ácidos nucleicos. La pentosa *ribulosa* es importante en la *fotosíntesis* (véase cap. 12). La hexosa *glucosa* constituye la fuente primaria de energía para la célula. Otras hexosas importantes son: la *galactosa*, que se halla en el disacárido lactosa, y la *fructosa* o *levulosa*, que forma parte de la sacarosa.

Los *disacáridos* son azúcares formados por la condensación de dos monómeros o monosacáridos con pérdida de una molécula de agua; su fórmula empírica por tanto es $C_{12}H_{22}O_{11}$. Entre las sustancias más importantes de este grupo están: la *sacarosa* y la *maltosa* en vegetales, y la *lactosa* en animales.

Los *polisacáridos* resultan de la condensación de muchas moléculas de monosacáridos con la correspondiente pérdida de moléculas de agua. Su fórmula empírica es $(C_6H_{10}O_5)_n$. Después de la hidrólisis dan lugar a moléculas de azúcares simples.

Los polisacáridos más importantes en biología son el *almidón*, el *glucógeno* y la *celulosa*. Los dos primeros representan sustancias de reserva en células vegetales y animales, respectivamente. El tercero es el elemento más importante de la célula vegetal. El *almidón* constituye una mezcla de dos polímeros. Uno, la *amilosa*, es lineal; el otro, la *amilopectina*, ramificado (fig. 4-7).

El glucógeno puede ser considerado como el almidón de las células animales. Es un polímero compuesto por muchas moléculas de glucosa y representa así una importante reserva de energía en el organismo. Se encuentra en numerosos tejidos y órganos, pero la mayor proporción está contenida en el hígado y músculos.

La celulosa constituye parte de la pared celular y también de una serie de otras estructuras que forman el esqueleto de sostén de los vegetales. Está compuesta por unidades de celobiosa que, por hidrólisis, da glucosa. Además de la celulosa, los tejidos vegetales contienen componentes estructurales como el xilano, los ácidos alginicos (en algas), ácido pectico, etc. (véase tabla 12-1).

Polisacáridos complejos.

Mucopolisacáridos. Mucoproteínas y glucoproteínas

Aparte de los polisacáridos mencionados, que están constituidos por monómeros de hexosa, existe gran número de largas moléculas más complejas que pueden llevar nitrógeno aminado (por ejemplo, glucosamina) o estar además acetiladas (por ejemplo, acetilglucosamina), o bien contener ácido sulfúrico o fosfórico. Todos estos polímeros tienen gran trascendencia en la organización molecular y, sobre todo, como constituyentes importantes de las sustancias intercelulares. Pueden existir libres o combinados con las proteínas. Los más importantes son:

Los *polisacáridos neutros*, que sólo contienen acetilglucosamina. El principal ejemplo es la *quitina*, sustancia de sostén que se encuentra en insectos y crustáceos.

Los *mucopolisacáridos ácidos*, que pueden contener en su molécula ácido sulfúrico u otros ácidos. A este grupo pertenecen la *heparina*, una sustancia anticoagulante; el *condroitinsulfato*, presente en el cartílago, piel, córnea, cordón umbilical, etcétera, y el *ácido hialurónico*, que se encuentra en la piel y varios tejidos animales. Este último es hidrolizado por la *hialuronidasa*.

Las *mucoproteínas* (mucoides) y las *glucoproteínas* son complejos de acetilglucosamina y otros carbohidratos con proteínas. En el primer grupo se hallan sustancias secretadas con la saliva, la mucosa gástrica, el ovomucoide, etc.; en el segundo, la ovoalbúmina, seroalbúmina, etcétera (para la histología química de estas sustancias véase cap. 7).

Lípidos

Forman un grupo de compuestos caracterizados por la relativa insolubilidad en agua y por ser solubles en solventes orgánicos. Esta propiedad general de los lípidos y compuestos relacionados se debe al predominio de largas cadenas hidrocarbonadas alifáticas o de anillos bencénicos. Tales estructuras son no polares e hidrófobas. En muchos lípidos las cadenas pueden estar adheridas a un grupo polar en un extremo, lo cual las convierten en hidrófilas y capaces de unirse al agua por uniones de hidrógeno.

Los lípidos se clasifican en:

Lípidos simples. Son ésteres alcohólicos de ácidos grasos. Entre ellos se encuentran:

1) *Grasas neutras* (glicéridos), a menudo denomi-

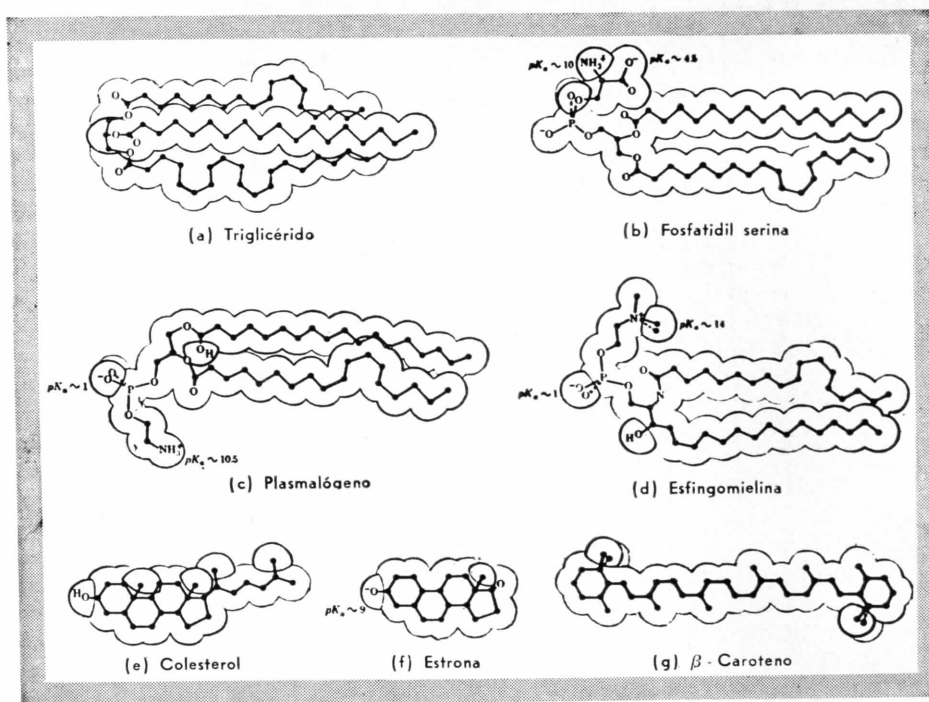


FIG. 4-8. Algunas moléculas lipídicas en las que se evidencia la disposición tridimensional y el tamaño relativo. (De J. L. Oncley.)

nadas triglicéridos (fig. 4-8, a), que son triésteres de ácidos grasos y glicerol.

2) **Ceras**, con punto de fusión más alto, que son ésteres de ácidos grasos con otros alcoholes en vez del glicerol. Un ejemplo es la cera de abeja.

Esteroides. Lípidos que se caracterizan por tener el núcleo ciclopenteno-perhidrofenantreno (fig. 4-8, e).

Pertenecen a los esteroides sustancias muy importantes en el organismo, como las hormonas sexuales (fig. 4-8, f) y las de la corteza suprarrenal, la vitamina D, los ácidos biliares, etcétera. Los esteroides que poseen un grupo $-OH$ se denominan **esteroles**. El **colesterol** está ampliamente distribuido y se encuentra en la bilis, cerebro, suprarrenales y en otros tejidos. Se halla a menudo en forma de éster unido con algunos ácidos grasos. Estereoquímicamente, los esteroides forman un sistema complejo en anillo más bien aplanado. En el caso del colesterol, la molécula es de unos 20 Å de longitud, 7 a 7.5 de ancho y 5 de espesor.

El grupo $-OH$ polar se encuentra en un extremo y el residuo no polar en el otro (fig. 4-8, e).

Lípidos compuestos o conjugados. Son aquellos que por hidrólisis dan lugar a otros compuestos además de alcohol y ácidos. Junto con los esteroides se denominan **lipoides** (parecidos a la grasa), debido a sus propiedades de solubilidad. Los lipoides sirven principalmente como componentes estructurales de las células, sobre todo en las membranas celulares.

Entre los lípidos compuestos se encuentran:

1) **Fosfátidos (fosfolípidos)**, que son diésteres del ácido fosfórico y pueden esterificarse con glicerol, esfingosina, colina, etanolamina, serina o inositol. A este grupo pertenecen la lecitina, la cefalina, los in-

sítosidos y los plasmalógenos o acetalfosfátidos (figura 4-8 y tabla 4-4).

2) Los **glucolípidos** o **esfingolípidos** se caracterizan porque el glicerol está reemplazado por el aminoalcohol **esfingosina**. Comprenden: a) Las **esfingomielinas** (fig. 4-8, d), que constituyen principalmente la vaina miélica de los nervios; b) los **cerebrósidos**, caracterizados por la presencia de galactosa o glucosa en la molécula; c) los **sulfátidos**, que contienen ácido sulfúrico esterificando a la galactosa, y d) los **gangliósidos** (tabla 4-4).

En el grupo de los glucolípidos, los gangliósidos merecen una mención especial, debido a su presencia en las membranas celulares y a su posible papel como receptores de partículas víricas y en el transporte de iones a través de las membranas (véase cap. 21). Como se advierte en la figura 4-9, un gangliósido es una molécula compleja que contiene esfingosina, ácidos grasos, hidratos de carbono (lactosa y galactosamina) y ácido neuramínico. Esta es una molécula muy larga y altamente polar.

3) Los **carotenoides** son pigmentos animales y vegetales, cuya fórmula general es $C_{40}H_{56}$. Los carotenos pueden aislarse de la zanahoria y son responsables de su color amarillo anaranjado. En los animales se depositan a menudo en las células de la piel, dándole color oscuro. Están vastamente distribuidos como pigmentos en el reino vegetal, habiéndose descrito α -, β - y γ -carotenos. A partir de estas sustancias, especialmente del β -caroteno, los tejidos animales sintetizan vitamina A.

El **retineno** se encuentra directamente relacionado con la vitamina A, pues, junto con un componente proteico, constituye la púrpura visual, que se localiza

TABLA 4-4. Clasificación de fosfátidos y glicolípidos

Nombre	Principal componente alcohólico	Otros componentes alcohólicos	Relación P:N
I. Glicerofosfátidos:			
1) Ácido fosfatídico	Diglicérido (= glicerol diéster)		1:0
2) Lecitinas	Diglicérido (= glicerol diéster)	Colina	1:1
3) Cefalinas	Diglicérido (= glicerol diéster)	Etanolamina, serina	1:1
4) Inosítidos	Diglicérido (= glicerol diéster)	Inositol	1:0
5) Plasmalógenos (acetalfosfátidos)	Éster de glicerol y enol éter	Etanolamina, colina	1:1
II. Esfingolípidos:			
1) Esfingomielinas	N-Acilesfingosina	Colina	1:2
2) Cerebrósidos	N-Acilesfingosina	Galactosa,* glucosa *	0:1
3) Sulfátidos	N-Acilesfingosina	Galactosa *	(1 SO ₃ H ₂)
4) Gangliósidos	N-Acilesfingosina	Hexosas,* hexosamina,* ácido neuramínico.*	

* Estos componentes no se encuentran como ésteres fosfóricos, sino más bien en uniones glicosídicas; por esta razón, los del grupo II, 2-4, se denominan glucolípidos.

en el segmento terminal de los conos y bastones de la retina.

Los carotenoides están químicamente relacionados con las *xantófilas*, de las cuales la *luteína* constituye un ejemplo. Este pigmento se encuentra en los cloroplastos de las hojas verdes, pero enmascarado por la presencia de la clorofila. Tan pronto como esta última disminuye, cuando las hojas se secan en otoño, la luteína se manifiesta. Además de

los carotenoides y de las porfirinas (clorofila, hemoglobina, etcétera), las flavinas deben ser mencionadas como pigmentos biológicamente importantes. En soluciones acuosas presentan color amarillo y una fluorescencia verde-amarillenta. A las flavinas pertenecen la lactoflavina de la leche y la riboflavina (vitamina B₂, etcétera). Como flavoproteínas forman algunas enzimas importantes: ciertas deshidrogenasas, aminooxidasas, etcétera.

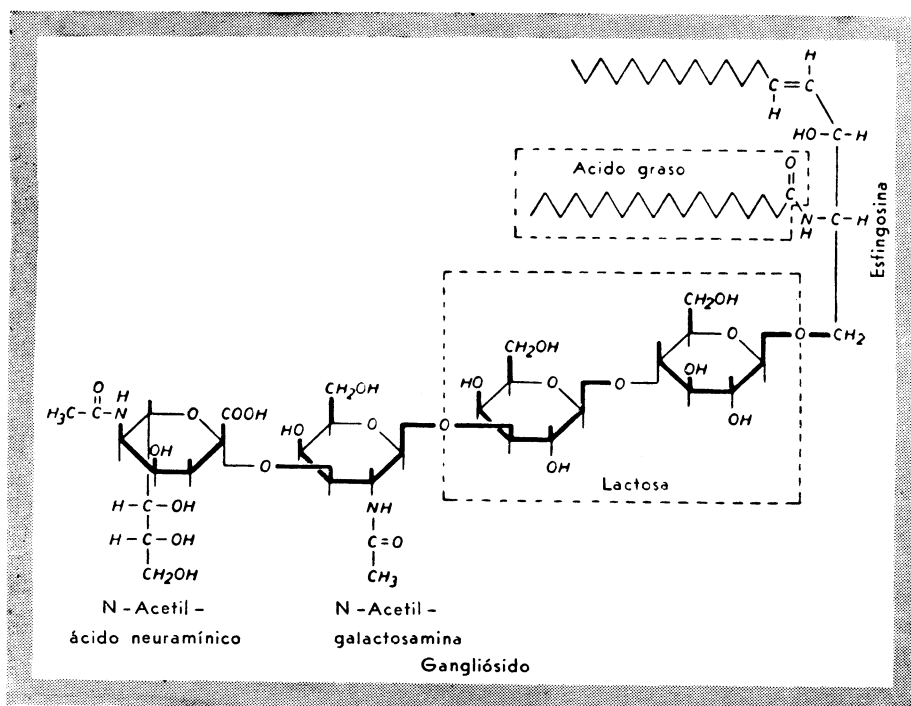


FIG. 4-9. Estructura molecular de un gangliósido. (De P. Karlson, 1963.)

Lípidos en Citología. Entre los lípidos de mayor interés citológico se incluye a los triglicéridos, compuestos de glicerol y ácidos grasos. Los tres grupos hidroxilo del glicerol pueden ser sustituidos por tres moléculas de ácidos grasos para formar un triéster (triglicérido). En los animales, los ácidos grasos más frecuentes que se combinan con el glicerol son el palmítico, el esteárico y el oleico. El tejido graso o adiposo se halla constituido principalmente por una mezcla de estos ésteres en proporciones variables. Desde el punto de vista esteroquímico, los ácidos grasos son largas cadenas hidrocarbonadas con un grupo polar $-\text{COOH}$ en un extremo. Esto hace que las grasas ácidas y otros lípidos sean sustancias altamente polarizadas, lo cual explica su orientación particular en presencia de solventes polares o no polares.

En el organismo, el papel de los lípidos varía considerablemente de acuerdo con su localización y disposición. Los glicéridos constituyen depósitos de energía. Los fosfolípidos y cerebrósidos se hallan principalmente en el tejido nervioso formando parte de la mielina. De los esteroides, los ácidos biliares actúan como emulsionantes para ayudar a la digestión; el colesterol es importante en las propiedades mecánicas de la epidermis y del cabello, y las hormonas esteroides regulan gran número de procesos metabólicos y reproductores esenciales. Componentes comunes de los tejidos son las *lipoproteínas*, es decir, lípidos unidos a una molécula proteica. Se encuentran en las membranas celulares, en la membrana nuclear y también en la sangre.

Desde el punto de vista citológico es importante diferenciar los lípidos "figurados",

fácilmente demostrables en las células con los métodos comunes de análisis histoquímicos, y los lípidos invisibles o "enmascarados". Los primeros son visibles por lo común en forma de gotas refringentes que dan con facilidad las reacciones típicas para los lípidos: ennegrecimiento del tetróxido de osmio, tinción con Sudán III, etcétera. Los lípidos "enmascarados" se demuestran indirectamente por análisis químicos.

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son compuestos químicos de la mayor importancia biológica. Todos los organismos vivos contienen ácidos nucleicos en la forma de *ácido desoxirribonucleico* (ADN) y *ácido ribonucleico* (ARN). Algunos virus poseen sólo ARN, como el virus del mosaico del tabaco, el de la poliomielitis, etcétera, y otros sólo ADN, por ejemplo, bacteriófagos, vacuna, adenovirus, etcétera.

Ambos tipos de ácidos nucleicos se encuentran en bacterias y en células superiores.

El ADN se localiza principalmente en el núcleo como constituyente de los *cromosomas*, cuando la célula se encuentra en división, y formando parte de la cromatina, en la interfase. El ADN nuclear está combinado con proteínas, constituyendo *nucleoproteínas*. También está presente en las mitocondrias, cloroplastos y probablemente en otros orgánoides autoduplicables.

El ARN se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el primero está presente en el nucléolo, nucleoplasma y cromatina. En el citoplasma constituye gran parte de los ribosomas (tabla 4-5).

TABLA 4-5. Ácidos nucleicos y estructura, reacciones y papel en la célula

	Ácido desoxirribonucleico	Ácido ribonucleico
Localización	Primariamente en el núcleo; también en mitocondrias y orgánoides autoduplicables	En el citoplasma, nucléolo y cromosomas
Bases pirimídicas	Citosina Timina	Citosina Uracilo
Bases púricas	Adenina Guanina	Adenina Guanina
Pentosa	Desoxirribosa	Ribosa
Reacción	Feulgen	Colorantes basófilos después del tratamiento con ribonucleasa
Enzima hidrolítica	Desoxirribonucleasa	Ribonucleasa
Papel en la célula	Información genética	Síntesis de proteínas

El estudio de los ácidos nucleicos se hará en los capítulos dedicados a Biología molecular, y sólo serán expuestas aquí sus principales características bioquímicas.

Componentes de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos tienen una estructura química compleja. Están formados por cantidades equimoleculares de hidratos de carbono (pentosa o desoxipentosa), bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y ácido fosfórico.

Los ácidos nucleicos son largas cadenas de polinucleótidos, que resultan de la unión de muchas unidades denominadas *nucleótidos* (fig. 4-10).

La tabla 4-5 da la localización y una nómina de las características químicas de los ácidos nucleicos y de las enzimas específicas que los hidrolizan. Además de los ácidos nucleicos, se han aislado de tejidos diversos nucleótidos más simples y de importancia biológica como los ácidos adenílico, guanílico e inosínico. Varios de estos nucleótidos son importantes como coenzimas y serán mencionados en el capítulo 5. Cada monómero del ácido nucleico es por tanto un *nucleótido*

y resulta de la combinación de una molécula de ácido fosfórico, una de pentosa y otra de purina o pirimidina. Dentro del nucleótido la combinación de una pentosa con una base constituye un *nucleósido*. Así, la desoxitimidina o *timidina* es el nucleósido de la timina.

Ácido fosfórico. Une los nucleótidos entre sí asociando las pentosas de dos nucleósidos consecutivos por medio de una unión éster-fosfato. Estas uniones se producen con el carbono 3' de un nucleósido y con el carbono 5' del siguiente (fig. 4-11). De este modo, el ácido fosfórico emplea dos de sus tres grupos ácidos. En que permanece libre confiere a la molécula la posibilidad de realizar uniones con proteínas básicas (por ejemplo, histonas y protaminas) y produce asimismo la fuerte basofilia de los nucleótidos, o sea, la propiedad de unirse a colorantes básicos (véanse cap. 7 y tabla 7-1).

Pentosas. Existen dos, una para cada tipo de ácido nucleico. La *ribosa* está presente en el ARN y la desoxirribosa en el ADN. En la última hay un oxígeno menos que en la ribosa. Tanto la ribosa como la desoxirribosa po-

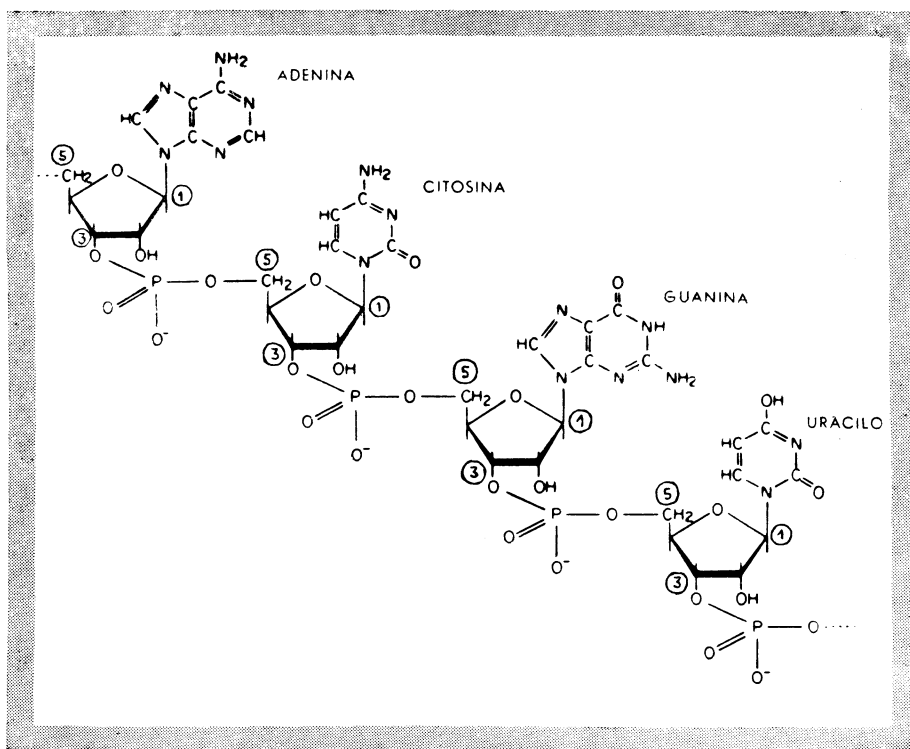


FIG. 4-10. Estructura química de una cadena polinucleotídica de ácido ribonucleico. Véanse los cuatro nucleótidos.

seen un anillo pentagonal con cinco carbonos, dos de los cuales (3' y 5') están unidos al ácido fosfórico y un tercero (carbono 1') a la base (fig. 4-10). En el capítulo 7 se verá que de la desoxirribosa depende la reacción de Feulgen, específica para el ADN.

Bases pirimídicas. Se denominan así porque derivan de la pirimidina, y comprenden principalmente: *citosa*, *timina* y *uracilo*. La citosina se encuentra tanto en el ADN como en el ARN, mientras que la timina es característica del ADN y el uracilo del ARN. Se puede encontrar en cantidades mucho menores la 5-metilcitosina en el ADN de los bacteriófagos.

El punto importante por recordar es que el ADN y el ARN difieren no sólo en la pentosa sino también en la base pirimídica (tabla 4-5). Esta característica, que es analizada en el capítulo 7, se utiliza citoquímicamente para el estudio de los ácidos nucleicos. La timidina radiactiva se emplea para marcar específicamente al ADN, y el uracilo radiactivo puede ser utilizado para el ARN.

Bases púricas. Comprenden principalmente a

la *adenina* y la *guanina*, que son comunes tanto para el ADN como para el ARN. En ciertas moléculas de ARN, y particularmente en el *ARN de transferencia*, existe gran proporción de bases que están metiladas (contienen, por ejemplo, metiladenina, metilguanina y metilcitosina). Todas las bases nitrogenadas tienen doble unión entre los carbonos, que alternan con uniones simples. Estas uniones pueden intercambiarse continuamente produciendo el fenómeno conocido como *resonancia*, el cual le confiere a las bases (y por tanto a los ácidos nucleicos) la propiedad de absorber la luz ultravioleta a 2600 Å. Una célula fotografiada con esta longitud de ondas ofrece el aspecto que se aprecia en la figura 4-12, en la que el nucléolo, la cromatina y todo el ARN citoplásmico absorben intensamente la luz ultravioleta.

Proporciones molares de las bases. Para satisfacer los requerimientos del apareamiento de las bases, en la hélice doble del ADN las relaciones entre adenina-timina y guanina-citosina deben ser siempre 1:1. Sin embargo, existe una variación notable en el ADN

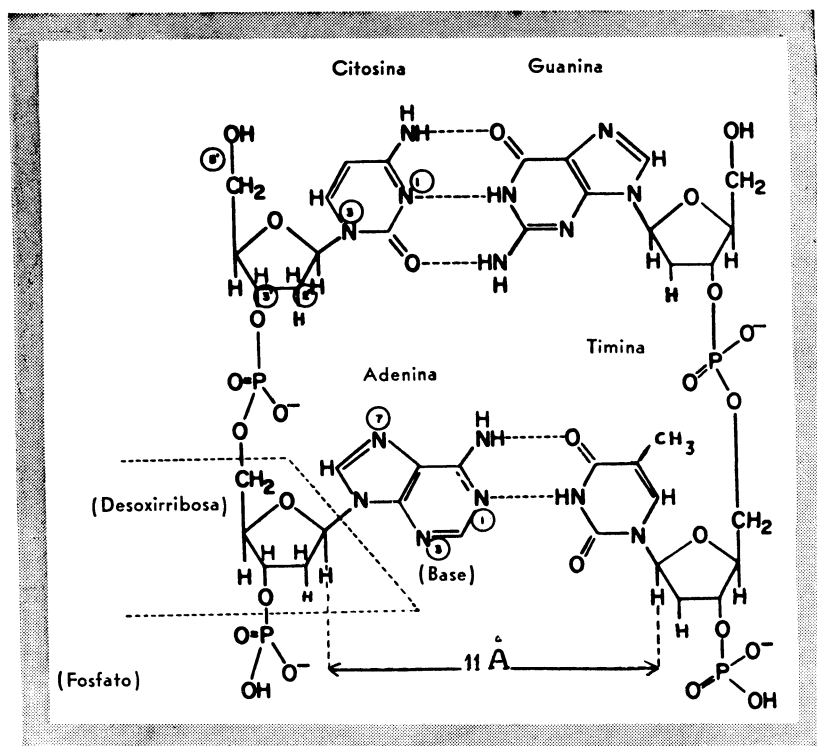


FIG. 4-11. Segmento de una molécula de ADN en la que se observan dos pares complementarios de bases (citosa-guanina, adenina-timina) con las uniones de hidrógeno entre ellas.

de diferentes especies en lo que respecta a los cocientes $A + T/G + C$. En plantas superiores y animales, $A + T$ excede a $G + C$, mientras que en los virus, bacterias y vegetales inferiores hay mucha mayor variación. Por ejemplo, en el hombre la relación $A + T/G + C$ es de 1.40, en tanto que en el *Mycobacterium tuberculosis* es 0.60. Evidencias citoquímicas y de otro tipo sugieren que algunas regiones cromosómicas puedan ser más ricas en AT o en GC.

El modelo de Watson-Crick del ADN. Nuestro conocimiento de la estructura del ADN adquirió un interés biológico mucho mayor cuando, después de estudios con difracción de rayos X realizados por Wilkins y Franklin, en 1953, Watson y Crick propusieron un modelo molecular espacial (en hélice doble). La importancia de este modelo radica en el hecho de que puede explicar mejor las propiedades fisicoquímicas y biológicas del ADN y especialmente su duplicación en la célula. Las características esenciales son (figura 4-13):

1) Cada molécula de ADN está compuesta por dos largas cadenas de polinucleótidos que corren en direcciones opuestas, formando una hélice doble alrededor de un eje imaginario central (fig. 4-13).

2) Cada nucleótido está dispuesto en un plano perpendicular al de la cadena polinucleótida.

3) Las dos cadenas se encuentran apareadas por uniones de hidrógeno establecidas entre el par de bases (fig. 4-11).

4) El apareamiento es altamente específico. En efecto, como existe una distancia fija de 11 Å entre las dos moléculas de desoxi-



FIG. 4-12. Célula nerviosa fotografiada con luz ultravioleta a 2600 Å. Las regiones en el núcleo y citoplasma que contienen ácido nucleico absorben en dicha banda. (De H. Hydén.)

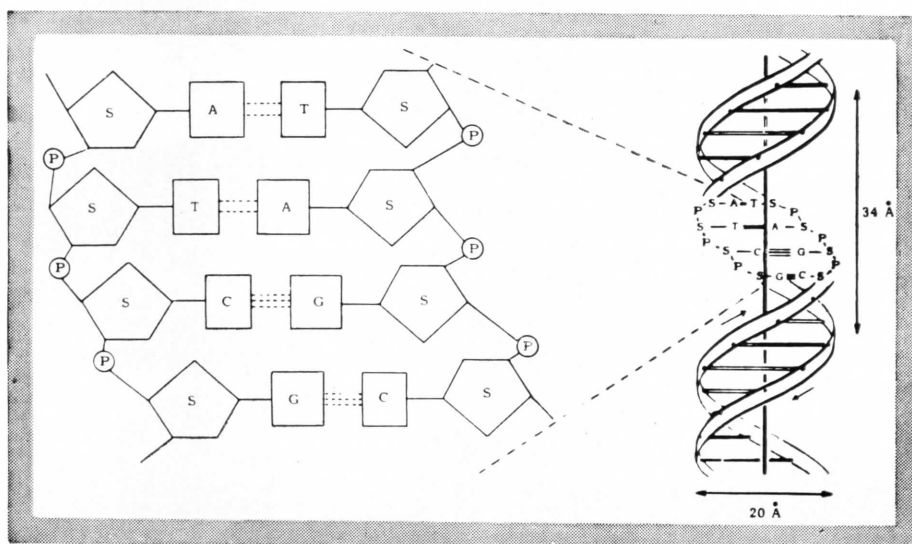


FIG. 4-13. El modelo de ADN de Watson-Crick. (Véase la descripción en el texto.)

ribosa en las cadenas opuestas, una base púrica sólo puede aparearse con una base pirimídica (fig. 4-13). Así, las parejas A-T y G-C son las únicas que se establecen. En la figu-

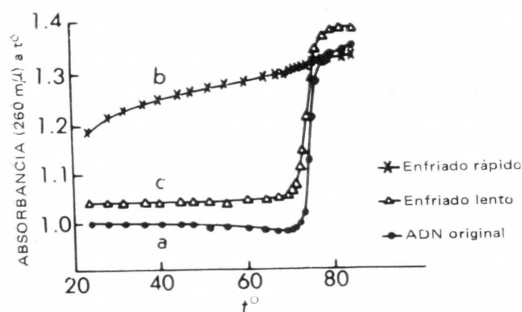


FIG. 4-14. Cambio hiper Cromático en el ADN del bacteriófago *T₂*. A una temperatura de 80°C se observa un brusco aumento de absorción a 260 mμ (a). En b y c, después de calentar el ADN a 91° se lo enfrió rápida (b) o lentamente (c). En este último caso, la estructura original del ADN vuelve a formarse. (De J. Marmur y P. Doty.)

ra 4-11 se observa que entre A y T hay dos puentes de hidrógeno y que entre C y G se forman tres uniones de hidrógeno. Esta formación de puentes de hidrógeno imposibilita el apareamiento entre A-C o G-T.

5) La *secuencia axil* de bases a lo largo de una cadena de polinucleótidos puede variar considerablemente, pero en la otra cadena la frecuencia debe ser complementaria; como se evidencia en el ejemplo siguiente:

1ª cadena: T, G, C, T, G, T, G, G, T, A.

2ª cadena: A, C, G, A, C, A, C, C, A, T.

De acuerdo con esta propiedad, dado un orden de bases en una cadena, la otra es exactamente su complementaria. Durante la duplicación del ADN las dos cadenas se disocian y cada una sirve como un molde para la síntesis de las dos moléculas complementarias. De esta manera se producen dos moléculas de ADN que tienen exactamente la misma constitución molecular.

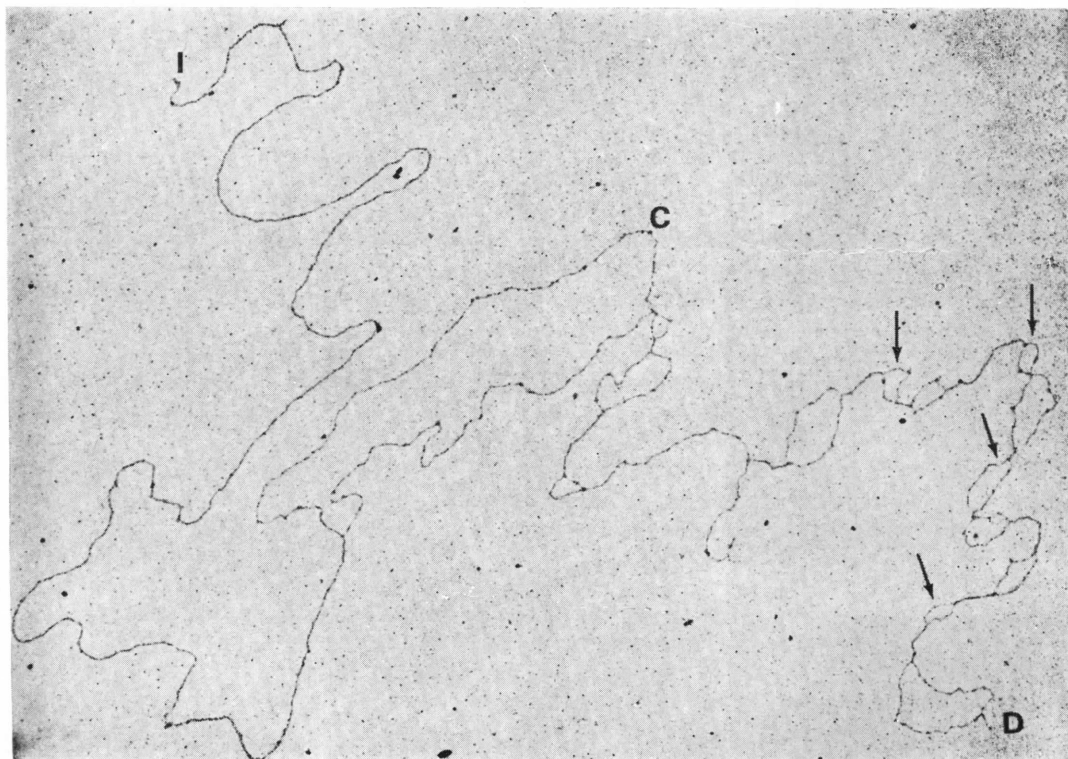


FIG. 4-15. Molécula de ácido desoxirribonucleico del bacteriófago lambda parcialmente desnaturada y coloreada con acetato de uranilo. (Véase la descripción en el texto.) El brazo izquierdo (I) no está abierto, mientras que el derecho (D) se halla desnaturado en más del 50 por ciento (flechas). La porción central (c) muestra una separación grande de las cadenas y tres más pequeñas. 48,000 X. (Cortesía de A. K. Kleinschmidt.)

La información genética del ADN depende de la secuencia de bases. El hecho de que cuatro bases sean suficientes para producir miles de características hereditarias diferentes se debe a que las moléculas de ADN son largos polímeros en los cuales puede ocurrir un enorme número de combinaciones.

Desnaturalización y renaturalización del ADN. Moléculas híbridas

Puesto que las dos cadenas de polinucleótidos del ADN están unidas mediante puentes de hidrógeno (fig. 4-11), elevando la temperatura a cerca de 100°C es posible romper dichos puentes y separar las cadenas. Este fenómeno, denominado *desnaturalización* o "*fusión*" del ADN, no es necesariamente irreversible. Si se realiza un enfriamiento lento, las dos cadenas complementarias pueden encontrarse y restituir la hélice doble normal, por un proceso de *renaturalización* (fig. 4-14). La desnaturalización del ADN se acompaña de un aumento en la absorción a 2600 Å, que puede ser registrado con el espectrofotómetro y constituye el *cambio hipercromático*. Este permite seguir muy fácilmente el cambio del ADN, aumentando la temperatura por arriba del punto de "fusión" y luego disminuyéndola lentamente (fig. 4-14). Debido a que se necesita mayor temperatura para romper las uniones G-C (tres puentes de hidrógeno) que para las A-T, es comprensible que los puntos de "fusión" y la temperatura del cambio hipercromático varíen para ácidos desoxirribonucleicos que poseen diferentes relaciones $A + T/G + C$. Determinando la temperatura en la cual el proceso está en la mitad de su desarrollo (T_m) ha sido posible conocer el contenido de $G + C$ de un ADN, por medio de la ecuación empírica:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (G + C)$$

donde $G + C$ se expresa en moles por ciento del contenido total de bases (Marmur y Doty, 1962).

El proceso de desnaturalización puede ser seguido con el microscopio electrónico. En la figura 4-15 se observa el interesante ejemplo del bacteriófago lambda sometido a 49°C. Esta temperatura provoca la separación de las cadenas de polinucleótidos en regiones localizadas del ADN ricas en pares A-T.

La capacidad de las moléculas de ADN

para denaturalizarse y renaturalizarse puede ser usada para formar *moléculas híbridas* con otro ADN y aun con ARN. Por ejemplo, se ha conseguido hibridizar una cadena de ADN humano con otra de ratón, aunque sólo en un 25 por ciento, indicando este porcentaje la semejanza genética entre las dos especies. Como se verá en capítulos posteriores, la hibridización del ADN es ya una técnica comúnmente utilizada en Biología molecular.

Estructura del ácido ribonucleico

La estructura primaria es similar a la del ADN, excepto que la desoxirribosa y la timina son reemplazadas en el ARN por ribosa y uracilo, respectivamente (fig. 4-10). Las moléculas pueden ser simples o dobles, como en el ADN. Tres clases de ARN se reconocen actualmente sobre la base del peso molecular y otras propiedades: 1) ribosómico, 2) mensajero y 3) de transferencia o soluble.

Estos tres tipos de ARN provienen del núcleo e intervienen en la síntesis de proteínas y enzimas. En los capítulos 17 a 20 se efectúa un estudio más detallado de los diversos tipos de ARN.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bernal, J. D.: (1962) The structure of molecules in Florkin and Stotz (eds.). *Comprehensive Biochem.*, 1, 113, Elsevier Press, Amsterdam.
- Cantarrow, A. and Schepartz, G.: (1962) *Biochemistry*, 3rd ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Chargaff, E. E.: (1958) Of nucleic acids and nucleoproteins. *Harvey Lect.*, ser. 52 (1956-1957).
- Crick, F. H. C.: (1957) Nucleic acids. *Scient. Amer.*, 197:188.
- Davidson, J. N.: (1960) *The biochemistry of the nucleic acids*. 4th ed. John Wiley and Sons, New York.
- Dayhoff, M. O. and Eck, R. V.: (1968) *Atlas of protein sequences and structures*. 1967-1968. National Biomed. Res. Found., Silver Springs.
- Fieser, L. F. and Fieser, M. (eds.): (1959) *Steroids*. Reinhold Publishing Corp., New York.
- Florkin, M. and Stotz, E. (eds.): (1963) *Comprehensive Biochemistry*, vol. 7, *Proteins*, part. I. Elsevier Press, Amsterdam.
- Florkin, M. and Stotz, E. (eds.): (1963) *Comprehensive Biochemistry*, vol. 5, *Carbohydrates*, Elsevier Press, Amsterdam.
- Ingram, V. M.: (1966) *The biosynthesis of macromolecules*. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Karls, P.: (1967) *Introduction to modern biochemistry*. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Kendrew, J.: (1966) *The thread of life*. Bell and Sons, London.

- Kossower, E. M.: (1962) *Molecular Biochemistry*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Marmur, J. and Doty, P.: (1962) Determination of Base Composition of DNA from its thermal denaturation temperature. *J. molec. Biol.*, 5:109.
- Nemethy, G.: (1967) Proteins (Binding forces in secondary and tertiary structures). *Encyclop. of Biochem.*, Reinhold Publ. Corp., New York.
- Pauling, L.: (1952) The hemoglobin molecule in health and disease. *Proc. Amer. Phil. Soc.*, 96:556.
- Pullman, B. and Weissbluth, M.: (1965) *Molecular biophysics*. Academic Press, New York.
- Reithel, J. F.: (1963) The dissociation and association of protein structures. *Adv. Protein Chem.*, 18:124.
- Reithel, J. F.: (1967) *Concepts in Biochemistry*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Sanger, F.: (1956) The structure of insulin. In: *Currents in biochemical research*. (Green, D. E., ed.) Interscience Publishers, New York.

Enzimas, metabolismo celular y bioenergética

La célula puede compararse a un minúsculo laboratorio, en el cual tienen lugar la síntesis y degradación de numerosas sustancias. Estos procesos son llevados a cabo por las enzimas a la temperatura normal del organismo, con moderada concentración iónica y dentro de límites estrechos de pH.

Las enzimas no se hallan distribuidas al azar en el interior de la célula, sino que se localizan en compartimientos celulares especiales y frecuentemente están dispuestas de manera ordenada dentro del esqueleto macromolecular de la célula y de los organoides celulares, constituyendo los *sistemas multienzimáticos*. Es esencial el conocimiento de la localización y agrupamiento de las enzimas en la estructura celular.

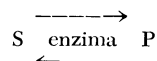
Puede definirse al *metabolismo* como la suma de todas las transformaciones químicas. Comprende tanto los procesos de *catabolismo*, por medio de los cuales las sustancias son degradadas, como los de *anabolismo*, que conducen a la síntesis de nuevos productos. Esta distinción es práctica pero sumamente arbitraria. Una reacción química puede ser catabólica en una dirección y anabólica en la opuesta.

Desde el punto de vista energético, las reacciones catabólicas son *exergónicas* en su mayor parte, es decir liberan energía, mientras que las reacciones anabólicas son *endergónicas*, o sea consumen energía. Por ejemplo, las diversas sustancias alimenticias que se incorporan a la célula —glucosa, aminoácidos, lípidos— son degradadas a moléculas menores con liberación de energía. Ésta puede ser retenida por sustancias como el adenosintrifostato (ATP), y utilizada por la célula para la síntesis de nuevas y más complejas moléculas.

El siguiente estudio de las enzimas es introductorio a la descripción de su citoquímica y sus funciones en los diferentes organoides celulares. Además se harán algunas consideraciones acerca del metabolismo celular susceptibles de contribuir a la interpretación de temas más específicos como la función de las mitocondrias y cloroplastos y el transporte activo, que se estudian en los capítulos correspondientes. Esta introducción es muy elemental y breve y deberá complementarse con lecturas en los tratados de Bioquímica y Enzimología.

ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas dentro de la célula o en los espacios extracelulares. Se trata de proteínas con uno o más sitios definidos de absorción a los que se adhiere el sustrato, es decir la sustancia sobre la que actúan las enzimas. El sustrato (S) se modifica y se convierte en uno o varios productos (P). Puesto que generalmente es una reacción reversible, puede escribirse de la siguiente manera:



en la cual la dirección de la reacción está dada por una constante de equilibrio. Las enzimas aceleran la reacción hasta que se alcanza el equilibrio de la reacción reversible.

Nomenclatura

La antigua terminología de las enzimas se basaba en su especificidad o capacidad para actuar sobre un sustrato específico. Por ejemplo, la enzima que forma ácido α -cetoglúta-

rico y amoníaco a partir del ácido glutámico en presencia de un cofactor oxidado (NAD) y una molécula de agua, se denominó glutámico-deshidrogenasa; la enzima que desdobla a pH elevado un monoéster ortofosfórico en un alcohol y ortofosfato, recibió el nombre de fosfatasa alcalina. En términos generales, las enzimas que actúan sobre polipéptidos (o proteínas) y los desdoblan en pequeños fragmentos de la cadena (oligopéptidos) o en aminoácidos fueron denominadas *proteinasas*. Actualmente, la terminología oficial se modificó obedeciendo a las indicaciones de la Unión Internacional de Bioquímica.

La nueva clasificación divide a las enzimas en seis grupos principales, de acuerdo con la reacción química que realizan:

- 1) Oxidorreductasas (reacciones de oxidoreducción).
- 2) Trasferasas (transferencias de grupos).
- 3) Hidrolasas (reacciones hidrolíticas).
- 4) Liasas (adición o remoción de grupos o de ligaduras dobles).
- 5) Isomerazas (catalizan isomerizaciones).
- 6) Ligasas o sintetazas (condensan dos moléculas con desdoblamiento de una unión de fosfato).

Especificidad

A diferencia de los catalizadores inorgánicos, la actividad enzimática es *específica*, pues cada enzima actúa sobre un sustrato predeterminado. Existen, sin embargo, dife-

rentes grados de especificidad. Cuando un solo sustrato es atacado, la especificidad se denomina *absoluta* (por ejemplo la succínico-deshidrogenasa); es *estereoquímica* cuando su acción depende de la configuración estereoquímica, y *relativa* si actúa sobre un conjunto de compuestos de un tipo determinado.

La figura 5-1 proporciona un ejemplo de la especificidad de las diferentes proteinasas. En este caso, la aminopeptidasa y la carboxipeptidasa separarán grupos amino y carboxilo terminales de la proteína. La *pepsina* es específica para el aminoácido tirosina (o fenilalanina); la *quimotripsina* es específica para el lado carboxílico de dichos residuos, y la *tripsina* para el extremo carboxílico de los residuos de arginina y lisina.

Reacciones en cadena

Aunque se pueden aislar las enzimas, éstas no trabajan en forma independiente dentro de la célula viviente. En la mayoría de los casos existen cadenas de reacciones químicas catalizadas por una serie de enzimas. En esas cadenas el producto de una reacción actúa como sustrato para la siguiente, y así sucesivamente. Se ha dicho que las reacciones químicas están "acopladas" dentro de la cadena o con otra cadena de reacciones. Se pueden dar numerosos ejemplos de reacciones en cadena. Así, el ciclo de Krebs, que se produce en las mitocondrias, es una cadena de reacciones que a su vez están "acopladas" con

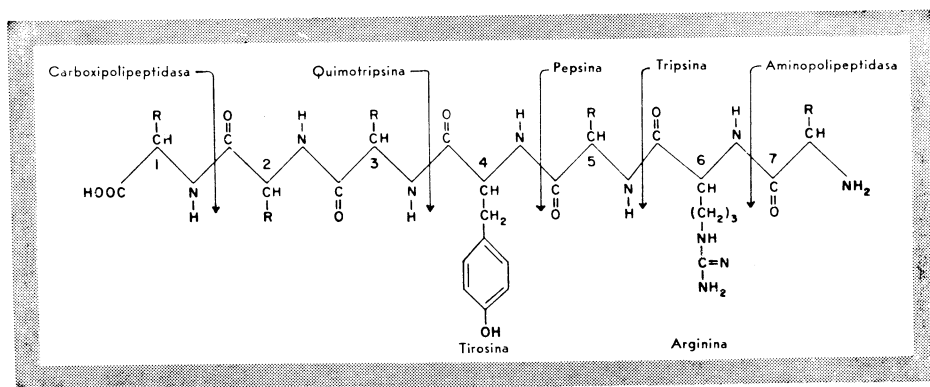


Fig. 5-1. Esquema que indica la especificidad de diversas enzimas proteolíticas. Los números se refieren a los residuos de aminoácidos, sólo dos de los cuales, la tirosina y la arginina, están marcados debajo. Las polipeptidasas son específicas: una para el extremo carboxílico libre (*izquierda*) de una molécula proteica o peptídica, y la otra para el extremo amino libre (*derecha*) de tales moléculas. La pepsina es específica para el lado amino de los residuos de tirosina (o fenilalanina) dentro de una molécula proteica. La quimotripsina es específica para el lado carboxilo de dichos residuos, y la tripsina, para el lado carboxilo de los residuos de arginina o lisina. (De A. C. Giese.)

otra cadena denominada respiratoria o sistema transportador de electrones (véase más adelante).

Factores que influyen en la actividad enzimática

Numerosos factores influyen sobre la actividad de las reacciones químicas; ésta depende del número de contactos o *colisiones* entre las moléculas de la enzima y del sustrato. La cantidad de moléculas enzimáticas comparada con la del sustrato es muy pequeña y cualquier factor que aumente el número de colisiones con el sustrato (por ejemplo, la temperatura) acelerará la reacción. Otro factor que actúa directamente sobre la enzima es, por ejemplo, la concentración de iones hidrógeno.

Existe un pH *óptimo* para cada enzima, en la mayor parte de los casos cercano a la neutralidad, en el cual la actividad es máxima. Por ejemplo, para la fosfatasa alcalina, el pH es 8,5-10; en cambio para la fosfatasa ácida, es de 4,5-5.

Temperatura. Hay también una temperatura *óptima*, que en los organismos homeotermos coincide generalmente con la del cuerpo. Con temperaturas mayores se puede producir una rápida inhibición y destrucción de la enzima por la desnaturalización proteica. Las temperaturas superiores a 56°C inactivan irreversiblemente las enzimas en la mayoría de los casos, aunque existen algunas como la ribonucleasa que no pierden su actividad incluso calentándolas a 80°C. Casi todas las reacciones enzimáticas son prácticamente reversibles de acuerdo con las condiciones termodinámicas, aunque el grado de actividad es rara vez el mismo en ambas direcciones.

La velocidad de la reacción depende de la *concentración relativa de la enzima y su sustrato*. Si la concentración de la enzima es alta, la velocidad inicial de la reacción aumenta en forma proporcional. Si se aumenta el sustrato, la actividad puede acelerar hasta alcanzar una determinada concentración. La enzima entonces se satura y su actividad cesa.

Activación. Algunas enzimas pueden hallarse en las células en una forma inactiva, llamada *cimógeno*, y son activadas por medio de las *quinasas*. Así, el tripsinógeno sintetizado por las células pancreáticas es activado en la cavidad intestinal por la enteroquinasa. El *pepsinógeno* secretado por las células principales del estómago es activado a su vez por el ácido clorhídrico (iones hidrógeno) que producen las células parietales. En este caso, la activación se debe a la ruptura de pequeños polipéptidos que probablemente enmascaran el sitio activo de la enzima (véase más adelante).

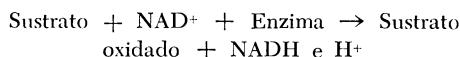
Otras enzimas hidrolíticas que requieren grupos sulfhidrilos ($-SH$), *papaína*, *catepsina*, necesitan para ser activadas agentes reductores como el glutatión.

Coenzimas. Grupos prostéticos

Algunas enzimas son proteínas conjugadas que tienen un *grupo prostético*. Por ejemplo, los *citocromos*, que transfieren electrones entre el sustrato y el oxígeno atmosférico, poseen un complejo de metaloporfirina.

Ciertas enzimas necesitan para su actividad el agregado de moléculas pequeñas, las coenzimas, que

se pueden unir durante la reacción. La enzima inactiva, también llamada *apoenzima*, más la *coenzima*, forman la *holoenzima* activa. Así, las *deshidrogenasas* utilizan la nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+) o la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato ($NADP^+$), denominados al principio difosfopiridín y trifosfopiridínucleótico (DPN y TPN, respectivamente). Su función es transferir el hidrógeno con dos electrones del sustrato, oxidándolo de la siguiente manera:



En la dirección opuesta, el sustrato es reducido. El $NADP$ y el $NADPH$ se comportan en forma similar. En la célula, los procesos catabólicos productores de energía requieren NAD^+ , mientras que en los procesos sintéticos interviene el $NADPH$. En muchas coenzimas, como el NAD^+ y el $NADP$, las partes esenciales están constituidas por vitaminas, especialmente del grupo B. Otros ejemplos son: el ácido pantoténico, contenido en la importante coenzima A; la riboflavina, incorporada a las moléculas de flavina-adenina-dinucleótido (FAD), y el piridoxal, o vitamina B_6 , cofactor de trasaminasas y descarboxilasas.

Sitio activo de la enzima

De acuerdo con nuestro concepto actual de la actividad enzimática, el sustrato se adhiere al componente proteico de la enzima en el denominado *sitio activo*. Las partes del sustrato sobre las cuales actúa la enzima, uniéndose a este sitio activo, establecen un tipo de relación llave-cerradura. Este concepto explica de manera muy sencilla la especificidad de la actividad enzimática.

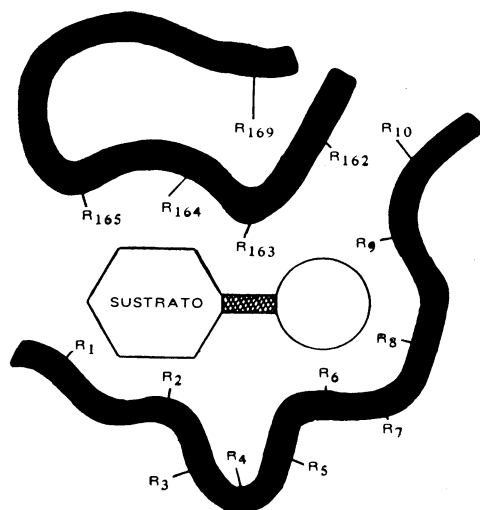


FIG. 5-2. Esquema del sitio activo de una enzima. La porción del sustrato con líneas cruzadas indica la unión que debe ser rota por la acción enzimática. R señala las cadenas laterales y las líneas gruesas dos segmentos de cadenas proteicas. (De A. Kohlsland.)

El sitio activo de una enzima está directamente relacionado con la estructura primaria de la proteína, puesto que corresponde a una secuencia especial de aminoácidos, pero depende también de las configuraciones secundarias y terciarias estudiadas en el capítulo 4 (figura 5-2). La idea de la relación "llave-cerradura", sin embargo, no explica todos los hechos, por lo que ha sido incorporado un nuevo concepto: el de "encaje inducido".^{1, 2} De acuerdo con éste, el sustrato, por medio de la interacción con los grupos reaccionantes de los aminoácidos o sitio activo, cambia la conformación de la enzima. En esa forma el sustrato puede verse rodeado de proteína enzimática y poner de manifiesto algunos grupos químicos (fig. 5-3). El estudio de la naturaleza molecular de la interacción entre sustrato y enzima es uno de

los problemas fundamentales de la Biología molecular

Isoenzimas

En un tiempo se pensó que existía una sola enzima capaz de actuar sobre un sustrato dado. Sin embargo, con el progreso en las técnicas de preparación, particularmente las *electroforesis sobre gel y almidón*, se puso de manifiesto la existencia de familias de enzimas con idéntica actividad enzimática. Está ahora perfectamente establecido que las denominadas *isoenzimas* resultan de cambios genéticos que determinan diferencias en la secuencia de aminoácidos, similares a aquellos que ocurren en las hemoglobinas y que serán considerados en los capítulos de Genética molecular (Latner y Skillen, 1968, y Weyer, 1968).

Hasta el presente se han reconocido más de cien enzimas que se hallan en forma de isoenzimas. Uno de los mejores ejemplos es el de la *deshidrogenasa láctica* que cataliza la reacción de piruvato a lactato. Hay cinco isoenzimas que difieren en su movilidad electroforética y punto isoelectrico, y cuya proporción relativa es característica en cada tejido y variable según las etapas de su diferenciación.

Cinética enzimática

Como ya se mencionó precedentemente, la actividad de la enzima depende de ciertos factores externos: temperatura, concentración de iones, hidrógeno, etcétera, que deben mantenerse constantes cuando se estudia su cinética. En tales condiciones, en presencia de un exceso de sustrato, la velocidad de la reacción catalizada por la enzima es por lo común proporcional a su concentración. En la reacción

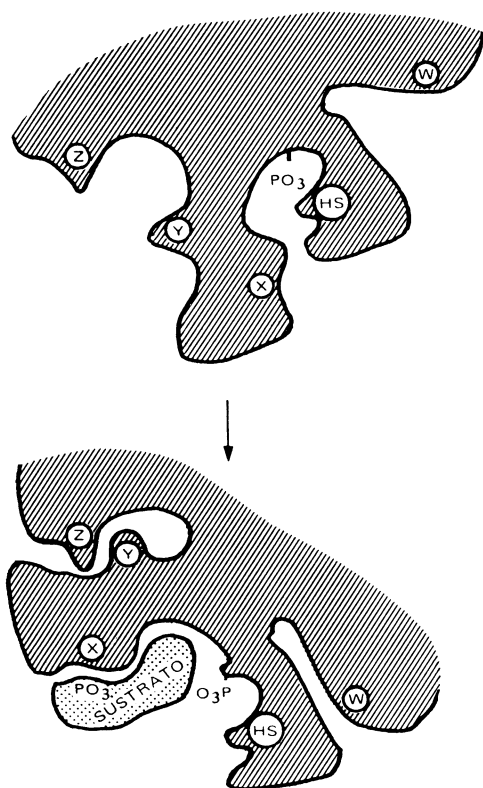


FIG. 5-3. Esquema que ilustra la flexibilidad de la enzima fosfoglucomutasa durante su actividad. Arriba se observa el sitio activo, en ausencia de sustrato. Abajo se ve el cambio conformacional que se produce en presencia del sustrato y que lleva a la exposición de un grupo $-SH$ y el ocultamiento de los otros grupos X, Y, Z y W (De A. Koshland.)

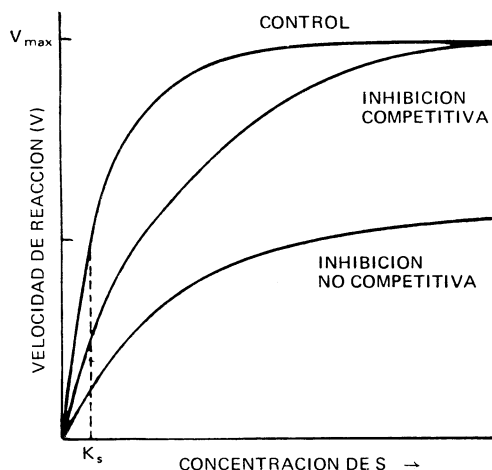
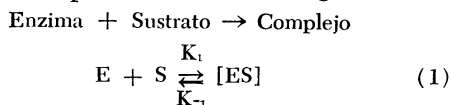


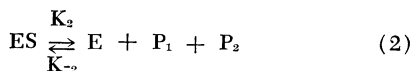
FIG. 5-4. Esquema que ilustra la cinética enzimática y los distintos tipos de inhibición. K_s , representa la constante de Michaelis; s , sustrato. V_{max} , velocidad máxima. (De I. W. Sizer.)

enzimática se supone generalmente que se forma un complejo de la manera siguiente:



donde K_1 es la constante de asociación para la formación del complejo y K_{-1} la constante de disociación.

En un segundo paso, el complejo ES da lugar a la formación de productos de reacción:



La figura 5-4 demuestra que la velocidad de la reacción enzimática (V) depende de la concentración de sustrato (S). La velocidad inicial aumenta rápidamente, siguiendo una reacción de primer orden; o sea que la cantidad del complejo enzima-sustrato formado es proporcional a la concentración del sustrato. Después de alcanzar una velocidad máxima (V_{mx}), el aumento del sustrato ya no influye sobre la velocidad de la reacción, y la curva se hace asintótica con la abscisa.

El punto $V/2$ indica la mitad de la velocidad máxima obtenida, y la proyección sobre la ordenada K_s representa la denominada *constante de Michaelis* para esa reacción (fig. 5-4). En otras palabras, la constante de Michaelis es igual a la concentración de sustrato en la que se alcanza la mitad de la velocidad de reacción. K_s se expresa en moles por litro de sustrato, y cuanto menor sea su número, mayor será la afinidad entre la enzima y el sustrato.

Una enzima puede ser muy específica, es decir, reaccionar con un solo sustrato, o bien hacerlo con varios. Este es el caso de la alcohol-deshidrogenasa, que actúa sobre diversos alcoholes convirtiéndolos en sus correspondientes aldehídos. La afinidad de una enzima por un sustrato puede ser entonces diferente para distintos sustratos, hecho que se deduce de la constante de Michaelis.

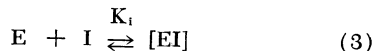
La *concentración de iones hidrógeno* desempeña también un papel importante en la cinética de una enzima. Representando gráficamente la actividad enzimática en función de valores crecientes de pH, desde el extremo ácido hasta la zona alcalina, pasando por la neutralidad, se obtiene una curva acampanada cuyo pico es el pH óptimo en el cual la enzima está en su máxima actividad. En medios muy ácidos o alcalinos la porción proteica puede desnaturalizarse, inactivándose la enzima irreversiblemente. Sin embargo, existen enzimas cuya actividad óptima tiene lugar en el extremo ácido, como la pepsina (pH 2), o en el extremo básico, como la fosfatasa alcalina (pH 8.5 a 10).

La *temperatura* es otro factor que influye sobre la cinética de las reacciones enzimáticas. Comenzando con temperaturas bajas y aumentándolas progresivamente, se alcanza una actividad óptima que luego

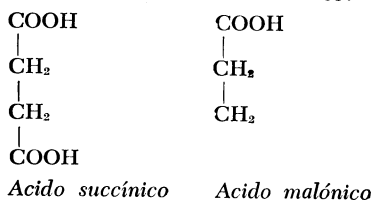
disminuye y por fin se detiene completamente. Esta disminución es consecuencia de la progresiva desnaturalización que experimenta la porción proteica de la enzima. Hay pocas enzimas, por ejemplo la adenilquinasa, que permanecen activas cuando se las somete a temperaturas de 100°C. Como en todas las reacciones químicas, la velocidad de la actividad enzimática sigue la ley de Van't Hoff: al aumentar la temperatura en 10°C, la velocidad de la reacción se duplica.

Inhibición enzimática

La *inhibición* de la actividad enzimática puede ser *competitiva* o *no competitiva*. En el caso de inhibición competitiva un compuesto de estructura similar a la del sustrato forma un complejo con la enzima, análogo al complejo ES:



donde E es la enzima, I el inhibidor y K_i la constante de asociación del complejo enzima-inhibidor. A diferencia del complejo con el sustrato (ecuación 1) el $[EI]$ no se desdobra en productos de reacción y enzima libre. Como ejemplo de tal inhibición se halla la succínico-deshidrogenasa, que es inhibida por el ácido malónico, cuya estructura molecular tiene similitud con la del ácido succínico:



En la inhibición competitiva, la afinidad del análogo por el sitio activo no es tan intensa como la del sustrato específico; por consiguiente, aumentando la concentración de este último, el inhibidor puede ser desplazado por el sitio activo. Se establecen así tres características de la inhibición competitiva: 1) falta de especificidad absoluta entre la enzima y un sustrato dado; 2) similitud estructural entre el sustrato y el inhibidor; 3) afinidad mucho más débil entre enzima e inhibidor que entre enzima y sustrato. La cuarta característica consiste en que K_s es mayor en el caso de complejos $[EI]$ que en complejos $[ES]$, aunque la velocidad máxima de reacción sea la misma en ambos (fig. 5-4).

En la inhibición no competitiva, la velocidad máxima es menor y directamente proporcional a la concentración del inhibidor (fig. 5-4). Esto depende también de la constante de asociación del complejo $[EI]$ pero es independiente de las concentraciones del sustrato. A pesar de ello no puede ser suprimida al aumentar el sustrato, debido a que el inhibidor reacciona con un sitio activo y asimismo con otra parte de la molécula enzimática. A diferencia de lo observado en el caso de la inhibición competitiva, el inhibidor no presenta necesariamente semejanzas estructurales con el sustrato.

Ambos tipos de inhibición son reversibles y el inhibidor puede ser extraído del sistema por diálisis u otros procedimientos. Sin embargo, existen tipos de inhibición irreversibles, en los cuales se forma una unión covalente con la enzima. A dicho grupo per-

tenecen, por ejemplo, el ácido yodoacético, que bloquea los grupos sulfhidrilos mediante su alquilación, o el ferrocianuro, que forma disulfuros. Concentraciones altas de metales pesados pueden producir desnaturalización irreversible de la porción proteica de una enzima, mientras que las concentraciones bajas inhiben los grupos sulfhidrilos reversiblemente.

Activadores enzimáticos

No obstante ser ésta una breve introducción a la cinética de las enzimas, debemos mencionar a los *activadores*. Se trata de sustancias químicas o iónicas que no participan en la reacción misma pero cuya presencia aumenta la velocidad de la actividad enzimática. Entre ellos se encuentran: el zinc para la anhidrasa carbónica, los iones magnesio para la piruvato-quinasa y el manganeso para la isocitrato-des-hidrogenasa. En dichos ejemplos es la enzima la que interacciona con el activador; en cambio, cuando el sustrato es el activado, el ión suele combinarse primero con éste, formando un complejo metal-sustrato que luego reacciona con la enzima. La influencia de los cationes puede ser estrictamente específica, como el Mg^{++} sobre la enolasa, o extenderse a cationes monovalentes y bivalentes. Un hecho interesante es que a menudo uno de los iones metálicos actúa como activador mientras que el otro cumple funciones inhibitorias; tal es el caso de algunas adenosintrifos-fatasas, activadas por Mg^{++} o Mn^{++} e inhibidas por Ca^{++} .

Regulación de la actividad enzimática. Transformaciones alostéricas

Considerando el gran número de enzimas que posee una célula y la diversidad de procesos necesarios para la función normal, surge como requerimiento la existencia de *mecanismos reguladores*. Así ocurre con las *hormonas* que actúan como reguladores del metabolismo celular. La *tiroxina*, por ejemplo, desaco-

pla la fosforilación de la oxidación (véase cap. 11), disminuyendo entonces la velocidad de síntesis del ATP en el ciclo de Krebs, con el correspondiente aumento en la velocidad de consumo de oxígeno. La *adrenalina* aumenta la formación de glucosa a partir del glucógeno, convirtiendo la fosforilasa *b*, inactiva, en fosforilasa *a*, activa, en presencia de ATP y de iones magnesio. La *insulina* inhibe la actividad de la hexoquinasa, que convierte la glucosa y el ATP en glucosa-6-fosfato y ADP.

Sin embargo, los mecanismos reguladores endocelulares son mucho más complicados y numerosos. Los inherentes al control genético, como la inducción y represión de la formación de enzimas, serán estudiados en los capítulos 19 y 20.

Aquí describiremos otros sistemas en los cuales tienen lugar las denominadas *transformaciones alostéricas*.^{3, 4} En ellos, la activación y disminución de la actividad enzimática no se obtienen por la presencia e interferencia de análogos de los sustratos, sino más bien debido a la existencia de metabolitos, sustancias de bajo peso molecular. Estos metabolitos no se ligan al sitio activo y se unen por el contrario a otras zonas de la proteína enzimática. Mediante esa unión producen un cambio de conformación en el sitio activo, del cual resulta un aumento o disminución de la afinidad enzimática hacia el sustrato. Aprovechando el hecho de que las enzimas alostéricas poseen una estructura cuaternaria (véase cap. 4), Gerhard y Schachman⁵ disociaron la aspartato-trascarboxilasa en dos subunidades: una posee el sitio activo de la enzima y la otra el sitio alostérico. Con el proceso de transformación alostérica se establecen importantes mecanismos reguladores dentro de la célula. Este tipo de regulación consiste frecuentemente en la inhibición de la actividad enzimática por la acumulación de sus productos; es la denominada *inhibición de retroali-*

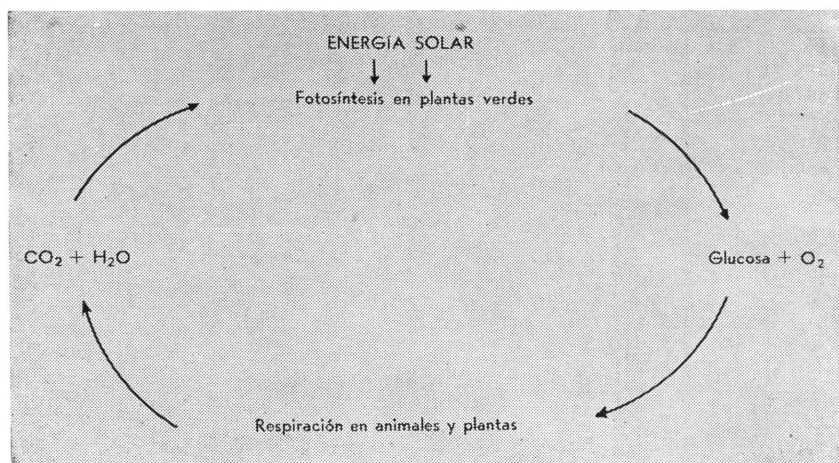


FIG. 5-5. Esquema de las transformaciones energéticas en vegetales verdes y en animales.

mentación (*feed back*). Por ejemplo: en *E. coli*, la biosíntesis de pirimidinas puede ser controlada por el citidintrifosfato, producto final de la cadena de reacciones, que actúa entonces sobre la primera enzima, la aspartato-trascarboxilasa (Monod y col., 1963).

METABOLISMO CELULAR

Ciclo de la energía

La fuente esencial de energía en los organismos vivos proviene del sol. La energía transportada por los fotones de la luz es absorbida por la clorofila, pigmento que está presente en los cloroplastos de los vegetales verdes, y se acumula como energía química en las diferentes sustancias alimenticias. Sin sol no existiría vida en la Tierra. Se ha calculado que toda la vida de nuestro planeta es extraída de sólo 0,24 por ciento del total de energía que le llega. Se puede clasificar a las células y organismos en dos clases principales, que difieren en el mecanismo y extracción de energía para su propio metabolismo. En la primera, llamada *autotrófica* (por ejemplo, plantas verdes), el CO_2 y el H_2O son transformados por el proceso de *fotosíntesis* en la molécula orgánica elemental de *glucosa*, a partir de la cual se sintetizan otras más complejas.

La segunda clase de células, denominadas *heterotróficas* (por ejemplo, células animales), obtienen la energía de diferentes sustancias alimenticias (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) que fueron sintetizadas por los

organismos autotróficos. La energía contenida en las moléculas orgánicas se libera principalmente por la combustión con el O_2 de la atmósfera (oxidación), proceso denominado respiración aerobia. La liberación de H_2O y CO_2 por los organismos heterotróficos completa este ciclo de la energía. En el esquema de la figura 5-5 se observa que las células vegetales pueden también obtener energía a partir de sustancias alimenticias sintetizadas en sus propios cloroplastos; es decir, se verifican tanto procesos autotróficos como heterotróficos. Existe un pequeño grupo de bacterias que son capaces de extraer energía a partir de moléculas inorgánicas, por un mecanismo que recibe el nombre de *quimiosíntesis*. Por ejemplo, la bacteria *Nitrobacter* oxida nitritos a nitratos ($\text{NO}_2^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$). Otras transforman óxidos ferrosos a férricos, y algunas oxidan SH_2 a sulfatos.

Transformación de la energía

La energía química o potencial de las sustancias alimenticias se encuentra en las diversas uniones covalentes entre los átomos de una molécula. Ello explica que durante la hidrólisis de una unión química (como la unión peptídica o la de un éster) se produzca la liberación de unas 3000 calorías por mol. En el caso de la *glucosa*, existe entre los átomos de C, H y O una cantidad de energía potencial de 686,000 calorías por mol (es decir por 180 g de glucosa) que puede ser liberada

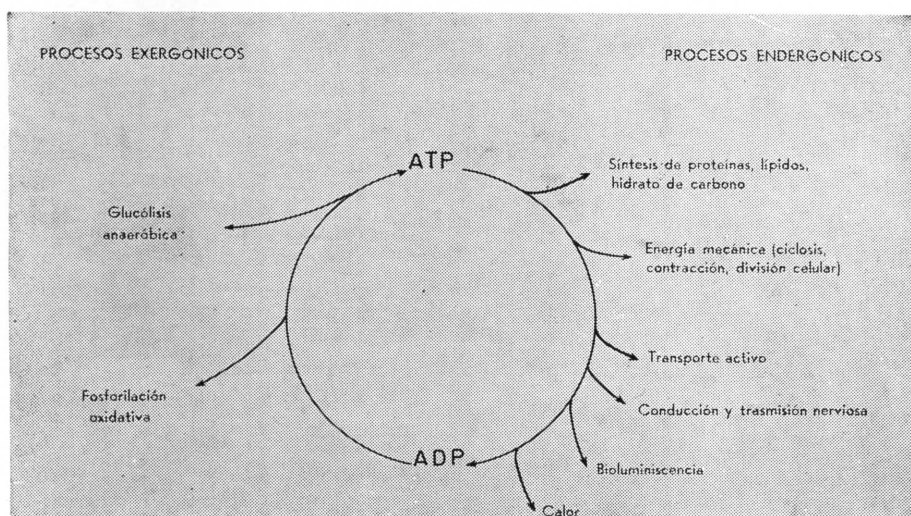
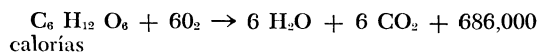


FIG. 5-6. Rueda de la energía de Baldwin donde se ven las relaciones entre los procesos exergónicos y endergónicos por medio del ATP.

por combustión, como se indica en la siguiente reacción:



Dentro de la célula viviente esta enorme cantidad de energía no se libera súbitamente como en la combustión la llama. Ocurre de modo gradual y controlado, empleándose docenas de enzimas oxidativas que convierten por fin el combustible en CO_2 y H_2O .

A diferencia de lo que sucede en el motor de un automóvil, dentro de la célula no se producen cambios repentinos de la temperatura. Sólo se disipa en forma de calor una parte de la energía liberada de las sustancias alimenticias; el resto se recupera en forma de una nueva energía química. La energía liberada en las reacciones exergónicas por la oxidación de sustancias, se emplea en diferentes funciones celulares. Como se ilustra en la figura 5-6, la energía es utilizada:

- 1) Para sintetizar nuevas moléculas (proteínas, hidratos de carbono, lípidos) por medio de reacciones *endergónicas*; las moléculas pueden ser entonces destinadas a reemplazar a otras o utilizadas en el crecimiento natural de las células.
- 2) Para realizar trabajo mecánico como en la división celular, ciclos o corriente citoplasmática, o en la contracción del músculo.
- 3) Para producir transporte activo en contra de un gradiente osmótico o iónico.

4) Para mantener los potenciales de membrana como en la conducción y transmisión de impulsos o para producir descargas eléctricas (por ejemplo, peces eléctricos).

5) En la secreción celular.

6) Para producir energía radiante como en la bioluminiscencia.

Sólo en las reacciones del primer grupo la energía proporcionada por las sustancias alimenticias se transforma en uniones químicas de energía. En las otras hay una transformación de energía química en otra forma de energía.

Uniones de alta energía. La figura 5-6 demuestra que entre estas transformaciones existe un eslabón común que es la molécula de *adenosintrifosfato* o ATP. Esta sustancia se encuentra en todas las células y tiene como característica principal la de poseer dos uniones con un potencial energético mucho más alto que todas las otras uniones químicas. Como se ve en la figura 5-7, el ATP está compuesto por la base púrica *adenina*, por *ribosa* y por tres moléculas de *ácido fosfórico*. La adenina más la ribosa forman el nucleósido *adenosina*, que a su vez con el primer fosfato constituye *adenosinmonofosfato* o *ácido adenílico* (AMP). Sin embargo, los compuestos importantes son el *adenosindifosfato* (ADP) y el *adenosintrifosfato* (ATP). Si representamos la adenosina con A y el fosfato con P, la fórmula simpli-

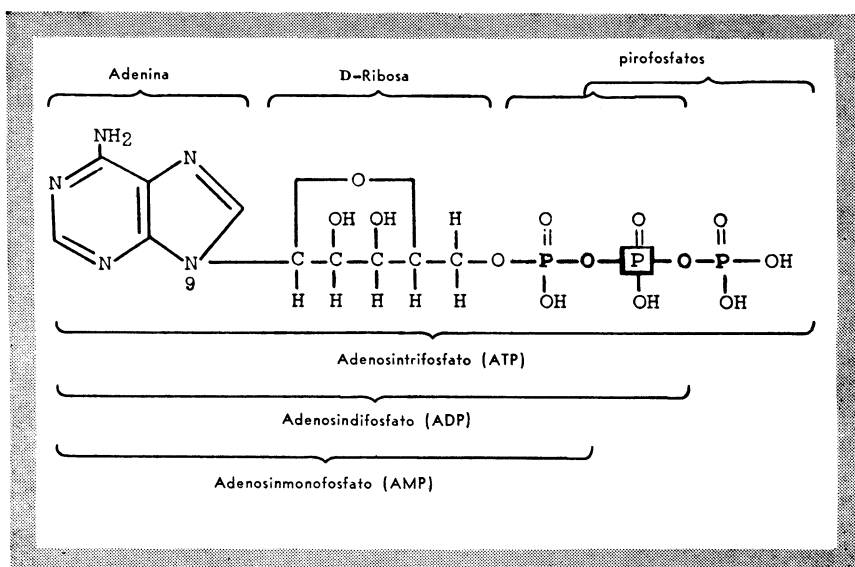
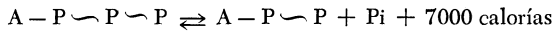


FIG. 5-7. Esquema de las moléculas de ATP, ADP y AMP. (De H. A. Harper.)

ficada del ATP y su transformación en ADP se expresa así:



Esta reacción indica que la liberación del fosfato terminal del ATP produce unas 7000 calorías en vez de las 3000 calorías de las uniones químicas comunes. En la figura 5-6 se ve que la reacción $ATP \rightleftharpoons ADP$ desempeña el papel central entre los procesos exergónicos que liberan energía y aquellos que acumulan o transforman energía en las dife-

rentes funciones celulares. La unión $\sim P$ rica en energía permite a la célula acumular una cantidad muy importante de energía en muy pequeño espacio y tenerla lista para ser usada tan pronto como se la necesita. La presencia de ATP explica por qué algunas funciones muy importantes, como la conducción nerviosa, pueden mantenerse por algún tiempo aun hallándose inhibida completamente la respiración.

En los últimos años se han demostrado otros nucleótidos que tienen uniones de alta ener-

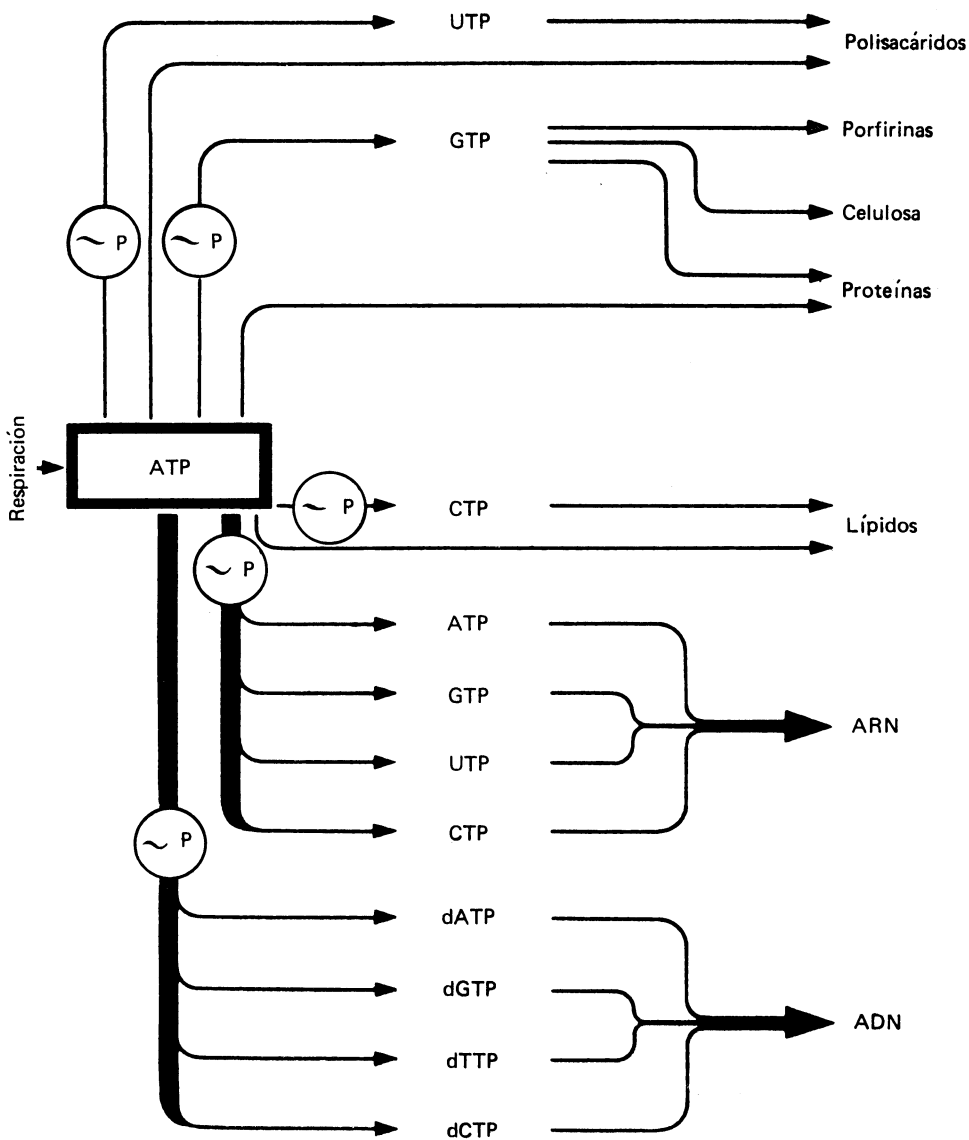
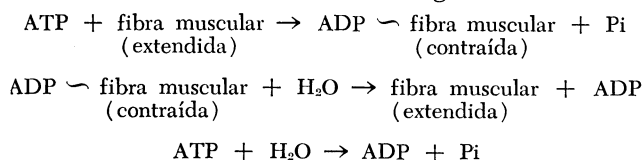


FIG. 5-8. Esquema del flujo de la energía provista por adenosintrifosfato a distintas rutas biosintéticas. (Cortesía de A. L. Lehninger.)

gía, como el citosintrifosfato (CTP), uridintrifosfato (UTP) y guanosintrifosfato (GTP), los cuales intervienen en reacciones biosintéticas. Sin embargo, la fuente última de energía para todos estos trifosfatos de nucleósidos la constituye el ATP, gracias a la intervención del grupo de enzimas nucleósido-difosfoquinasas. Los trifosfatos de uridina, guanosina y citosina canalizan la energía obtenida por la transferencia del P terminal en los diferentes procesos sintéticos. En la figura 5-8 se indican los trifosfatos de nucleósidos del tipo de la ribosa y la desoxirribosa que son usados como fuentes de energía para los procesos de síntesis de importantes compuestos biológicos. Puentes fosfato de alta energía se encuentran también en la fosfocreatina, acetilfosfato y ácido fosfoenolpirúvico.

El ATP es un polielectrólito con 5 cargas negativas que se halla normalmente unido a cationes divalentes como el Ca^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} . La unión fosfato terminal se libera por medio de la enzima adenosintrifosfatasa (ATPasa). Por ejemplo, en el músculo (véase cap. 23), la miosina tiene actividad de ATPasa y puede liberar P_i del ATP. La conversión mecanoquímica en el caso del músculo es la siguiente:



Este es un ejemplo excelente de cómo la estructura y la función se encuentran acopladas en el nivel molecular (véase cap. 23).

BIOENERGETICA

En la sección previa se puntualizaron diversos conceptos acerca de los ciclos de energía y transformaciones que tienen lugar en la célula, y se señaló que dichas fuentes existen en forma de compuestos de alta energía. La célula usa sólo parte de la *energía total* (H) o *entalpía* contenida en un compuesto químico. Esta es la denominada *energía libre* (F), que no se disipa como calor. Expresada como cambio de energía:

$$\Delta H = \Delta F + T\Delta S \quad (4)$$

La ecuación revela que el cambio de la energía total (ΔH) es igual al cambio en la energía disponible o libre (ΔF) más la ener-

gía no disponible ($T\Delta S$), que se disipa como calor. En la ecuación, T es la temperatura en grados Kelvin y S la denominada *entropía* del sistema.

Concepto de entropía

Es de fundamental importancia tener una noción de lo que significa entropía en los sistemas biológicos. Hemos visto ya que representa la fracción de la energía total que no se encuentra libremente disponible. En la ecuación (4) ΔS es una medida de la irreversibilidad de la reacción. Cuanto mayor sea la entropía, tanto mayor será la energía ($T\Delta S$) no disponible y menos reversible el proceso.

De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, la entropía de un sistema aislado de reacciones tiende a aumentar hacia un máximo, punto en el cual se alcanza el equilibrio y la reacción se detiene. El concepto de entropía está también relacionado con el de "orden" y "desorden". Cuando los átomos de una molécula se disponen ordenadamente la entropía es baja y ésta aumenta si durante la reacción existe tendencia al desorden molecular. Termodinámicamente, está bien establecido que el flujo de energía tiene lugar desde un nivel superior a uno in-

ferior, fenómeno acompañado del aumento de la entropía. En un sistema frío (de baja energía) las moléculas que se mueven más despacio están mejor organizadas desde un punto de vista estadístico; sin embargo, cuando el calor (de un sistema más caliente) fluye calentando los sistemas de baja energía, las moléculas comienzan a moverse más rápido y forman un sistema más desordenado. Como ejemplo ilustrativo puede servir la construcción y destrucción de una casa: se requiere gran cantidad de energía (en forma de esfuerzo laboral, energía calórica y eléctrica, etcétera) para construirla, pero se necesita infinitamente mucho menos esfuerzo para destruirla. La diferencia entre la gran cantidad de energía que se puso en la construcción y lo poco que se necesitó para destruirla revela la existencia de una gran pérdida de energía que corresponde a la entropía.

En una molécula proteica la secuencia de aminoácidos se halla determinada en forma muy precisa (véase cap. 4), por lo cual existe un alto grado de orden y una entropía baja. La síntesis de dicha molécula, partiendo de los aminoácidos individuales, requiere cantidades considerables de energía o "trabajo" (reacción endérgica). Esta reacción sintética es entonces muy reversible. Por otro lado, el desdoblamiento de proteínas específicas en aminoácidos o en anhídrido carbónico y agua es un proceso sumamente reversible, que suministra considerable energía (reacción exérgica).

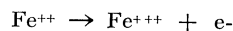
Cuando la energía es forzada a fluir en dirección opuesta (de niveles inferiores hacia los superiores), la entropía disminuye; sin embargo, dichos procesos son imposibles desde el punto de vista termodinámico, a menos que estén conectados con otros sistemas en los cuales la entropía aumente paralelamente, es decir, compense la disminución de los primeros. En la célula vegetal, la síntesis de glucosa a partir del anhídrido carbónico y agua con acumulación simultánea de la energía solar en la molécula, se acompaña de una gran disminución de la entropía. Pero este sistema se halla estrictamente ligado a la oxidación de la glucosa por la célula animal, proceso en el cual la entropía aumenta notablemente satisfaciendo los requerimientos de la segunda ley de la termodinámica; la entropía debe siempre aumentar.

Los conceptos precedentes son de gran importancia en los sistemas biológicos, puesto que las células se caracterizan por su alto

grado de ordenamiento, tanto en su estructura subcelular como molecular. Cuando la vida de la célula se extingue, tiene lugar la desintegración de dicha estructura, con el considerable aumento de la entropía.

Concepto de oxidación y reducción

El estudio de las oxidaciones biológicas comenzó con Lavoisier en 1780, cuando demostró que los animales toman O_2 del aire, produciendo CO_2 . Entonces se consideró a la oxidación como el proceso por medio del cual el O_2 es agregado a una sustancia, siendo la reducción el fenómeno opuesto, es decir la remoción de O_2 . Después se aplicó la misma denominación al proceso que conduce a la remoción de H_2 . Este se denomina también deshidrogenación (u oxidación). Finalmente, idéntica terminología fue empleada para reacciones en las que existe una transferencia de electrones; por ejemplo, la conversión del ión ferroso en férrico por la pérdida de un electrón.



En la actualidad, se considera que la característica más importante de una oxidación es la pérdida de electrones, pudiendo acompañarse o no de la adición de oxígeno y la pérdida de hidrógeno.

Estos procesos son catalizados por enzimas denominadas genéricamente *oxidazas*. Otro grupo de reacciones, que es el más frecuente en Biología, está catalizado por *deshidrogenasas* que remueven el hidrógeno del sustrato.

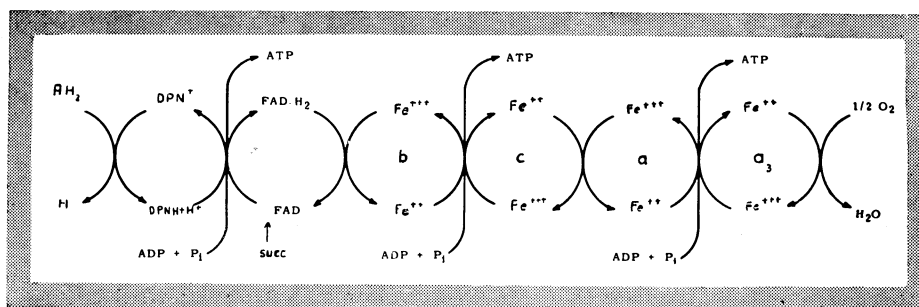


FIG. 5-9. Esquema de una cadena respiratoria. AH_2 , sustrato; A, sustrato oxidado; FAD, flavoenzima; b, c, a, serie de citocromos; a_3 , citocromooxidasa. La mayor parte de los sustratos son deshidrogenados por el DPN + TPN + dependientes de las deshidrogenasas. Véase que el succinato (*succ.*), va directamente al citocromo por vía de la succinodeshidrogenasa. Se indican los tres puntos, a lo largo de la cadena, en los cuales probablemente se produce la fosforilación con formación de ATP. La cadena respiratoria completa está unida en el extremo izquierdo al ciclo de Krebs y recibe el H^+ y los electrones producidos en ella por medio de las deshidrogenasas específicas.

Como se estudiará en el capítulo 11, tanto las *oxidasas* como las *deshidrogenasas* están contenidas en las mitocondrias y por su trabajo coordinado constituyen las diferentes etapas de la cadena respiratoria.

Deshidrogenasas. Estas enzimas extraen el hidrógeno de sustratos en presencia de coenzimas (NAD, NADP, flavina y sus nucleótidos, etcétera) que actúan como aceptores. La actividad de las deshidrogenasas se estudia espectrofotométricamente aprovechando el hecho de que los nucleótidos reducidos tienen un pico de absorción a 340 Å; por tanto, la reducción del NAD⁺ y del NADP⁺ por una deshidrogenasa puede manifestarse por el aumento de la absorción, y la oxidación, por su decrecimiento.

Las deshidrogenasas que actúan a través del NAD⁺ o del NADP⁺ son en general *flavoproteínas* (*enzimas amarillas*), cuyo grupo prostético es la riboflavina. Las flavoproteínas intervienen como agentes de transferencia del hidrógeno a un aceptor. Las deshidrogenasas no necesitan oxígeno para su actividad y no transfieren el hidrógeno del sustrato directamente al O₂. Para esta parte de la cadena oxidativa se requieren otros sistemas enzimáticos que trabajen con el oxígeno molecular.

Citocromos. La función a la que se hizo referencia es realizada por los *citocromos*, hemoproteínas de amplia distribución en la naturaleza, que contienen hierro. Como fue demostrado por Keilin, los citocromos *a*, *b* y *c* pueden ser distinguidos espectroscópicamente en la célula viviente por sus diferentes bandas de absorción, que representan la sustancia en su forma oxidada o reducida. El citocromo *a₀* es probablemente idéntico a la enzima *citocromoxidasa* que posee cobre, y que fue conocida por mucho tiempo gracias a su propiedad de formar azul de indofenol en presencia del reactivo de Nadi de Ehrlich (α -nafтол y para-fenilendiamina; cap. 7).

La cadena respiratoria (figura 5-9) se basa en el transporte de electrones a lo largo de sucesivos citocromos, con cambio de la forma reducida, ferrocitocromo (Fe⁺⁺), a la oxidada, ferrocitocromo (Fe⁺⁺⁺).

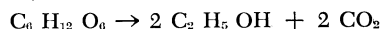
Respiración celular

Ahora es posible comprender mejor los procesos exergónicos producidos en la célula, por medio de los cuales las sustancias se oxidan

y se libera la energía química. Todos estos procesos se agrupan con el nombre de *respiración celular*. Ya hemos visto que para descomponer una molécula orgánica las células emplean principalmente deshidrogenaciones, que pueden ser llevadas a cabo en presencia o ausencia de O₂ atmosférico. Existen por tanto dos tipos de respiración: 1) respiración aerobia y 2) respiración anaerobia. Esta última se denomina también fermentación (tabla 5-1).

Respiración anaerobia (fermentación). Esta denominación se aplica a las reacciones exergónicas por medio de las cuales son degradadas moléculas complejas sin participación de oxígeno molecular. Ya que el ejemplo mejor conocido es el de la degradación de la glucosa, el proceso se denomina también glucólisis anaerobia. El término *fermentación* es más usado para microorganismos y vegetales.

La cadena de seis carbonos de la glucosa puede ser degradada en diferentes moléculas más pequeñas. Por ejemplo, en el músculo cada molécula de glucosa es convertida en dos de ácido láctico. En la levadura los principales productos son etanol y CO₂, como se observa en la siguiente reacción general denominada *fermentación alcohólica*:



En otros microorganismos los productos de fermentación consisten en: butanol, acetona, ácido acético, etcétera. En 1861, Pasteur demostró que la levadura es susceptible de producir alcohol en ausencia completa de oxígeno. Postuló que las células vivientes pueden obtener energía, sea empleando oxígeno, es decir, en *aerobiosis*, o bien el mecanismo de fermentación, esto es, en *anaerobiosis*.

En el caso del músculo la reacción general de la glucólisis es:

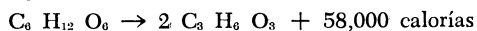


TABLA 5-1. Diferencias entre respiración aerobia y anaerobia

<i>Respiración aerobia (fosforilación oxidativa)</i>	<i>Respiración anaerobia (fermentación)</i>
Usa O ₂ molecular.	No usa O ₂ molecular.
Degrada glucosa a CO ₂ y H ₂ O.	Degrada glucosa en triosas y otros compuestos orgánicos.
Exergónica.	Exergónica.
Recupera cerca del 50 % de energía química.	Recupera menor proporción de energía química.
Presente en la mayoría de los organismos.	Presente en algunos microorganismos, e importante en células embrionarias y neoplásicas.
Enzimas localizadas en mitocondrias.	Enzimas localizadas en la matriz citoplasmática.

Esta reacción demuestra que la hexosa es desdoblada en dos triosas con liberación de menos del 10 por ciento de la energía contenida en la glucosa (686,000 cal). El producto clave de la glucólisis es el *ácido pirúvico*, que en condiciones anaeróbicas se convierte en ácido láctico; sin embargo, en presencia de oxígeno, el ácido pirúvico se incorpora al ciclo de Krebs. (Para un estudio detallado de todos los pasos de la glucólisis el lector deberá consultar los textos de Bioquímica y Enzimología.)

En la glucólisis (ciclo de Embden-Meyerhof), la molécula de glucosa es fosforilada

para formar ésteres fosfóricos y experimenta un desdoblamiento en dos moléculas de triosa que, finalmente, forman piruvato. Es éste un verdadero sistema multienzimático donde los productos de una etapa enzimática sirven como sustrato de la enzima siguiente en la cadena. En el esquema simplificado (figura 5-10), la molécula de glucosa sufre dos fosforilaciones, siendo el ATP el dador de fosfato. La ruptura de una molécula de glucosa proporciona cuatro moléculas de ATP. El resultado es un balance positivo de dos moléculas de ATP.

En la misma figura se enumeran la secuen-

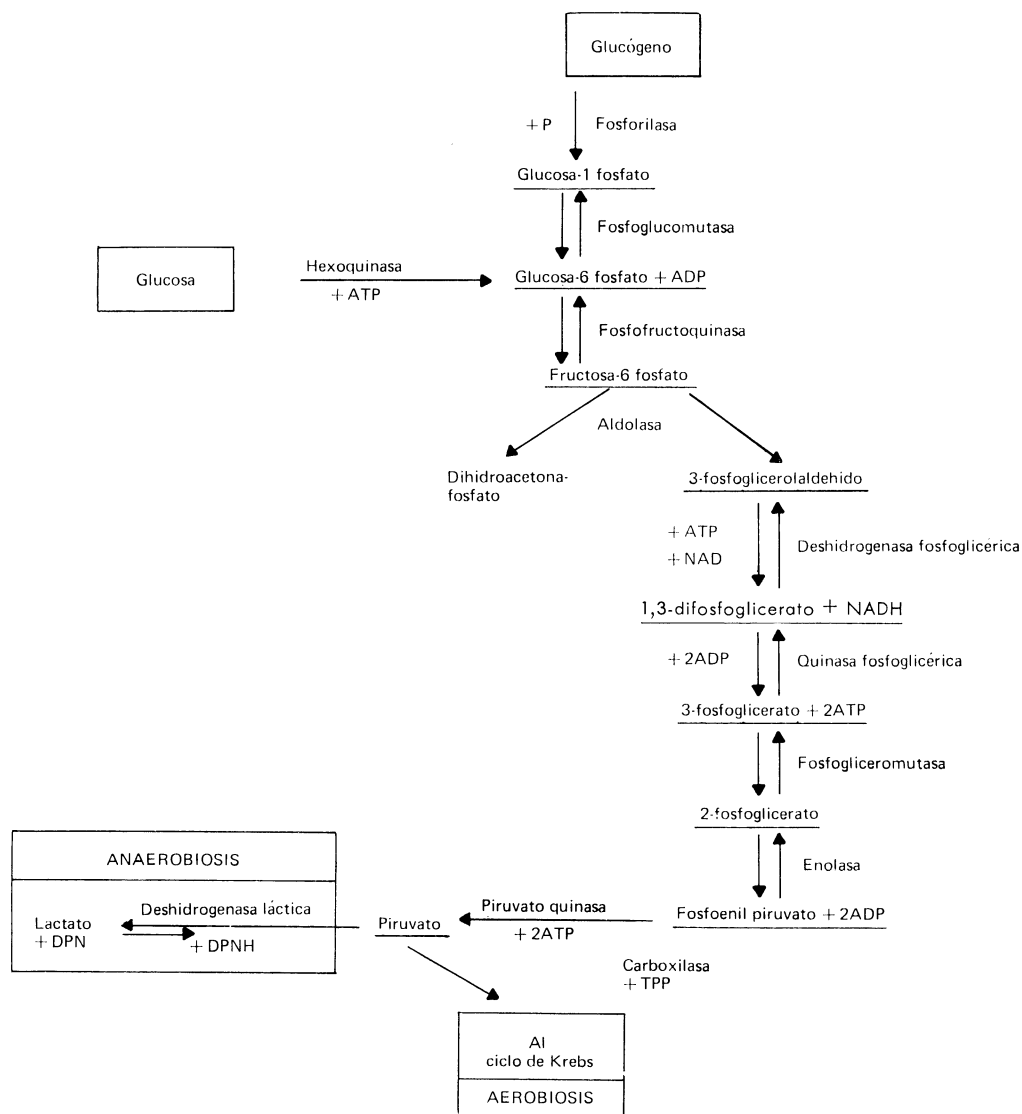


FIG. 5-10. Esquema de la glucólisis.

cia de los cambios químicos y las enzimas implicadas en la glucólisis. La formación de piruvato a partir de la glucosa o del glucógeno es independiente de la presencia de oxígeno; no obstante, en condiciones anaeróbicas el piruvato es convertido en lactato, mientras que en aerobiosis forma "acetato activo". Éste junto con la coenzima A constituye acetilcoenzima A, que entra en el ciclo de Krebs donde tiene lugar su oxidación completa en anhídrido carbónico y agua. Si el hidrato de carbono es el glucógeno, la glucólisis comienza por su despolimerización, con incorporación directa del fosfato en sus monómeros, produciendo glucosa-1-fosfato, que es convertida en glucosa-6-fosfato; luego, el ciclo continúa en forma idéntica al de la glucosa. Todas las enzimas del ciclo de Embden-Meyerhof se localizan en la subfracción celular "soluble" que proviene de la matriz del citoplasma.

Es de consenso general que la anaerobiosis representa, filogenéticamente, un sistema primitivo de producción de energía, de acuerdo con nuestros puntos de vista acerca de la composición de la atmósfera en los períodos tempranos de la vida sobre la Tierra. Con el aumento del oxígeno del aire se desarrolló la glucólisis aeróbica, un sistema mucho más económico en lo que respecta a la producción de energía. Sin embargo, la glucólisis anaeróbica sigue siendo el principal ciclo exergónico en gran número de microorganismos, en los estadios iniciales del desarrollo embrionario y en las células neoplásicas.

Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa

La respiración aeróbica es la serie de reacciones por las cuales las sustancias orgánicas son desdobladas en CO_2 y H_2O en presencia de oxígeno molecular. Su fase final tiene lugar en las mitocondrias y está íntimamente relacionada con la estructura molecular de estas últimas (véanse cap. 11 y tabla 4-1). Como ya se ha dicho, el piruvato es el compuesto clave en el desdoblamiento de los hidratos de carbono, incorporándose en presencia de oxígeno al ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo tricarbóxico). En este último (fig. 11-9) tiene lugar la combustión del piruvato, aunque no espontáneamente, sino a través de una serie de intermediarios y con la formación simultánea de puentes de alta energía (síntesis de ATP).

El primer paso del ciclo de Krebs es la condensación del acetato con *oxalacetato* (un compuesto de cuatro carbonos) para formar *citrato*, de seis carbonos. Sigue a ello una serie de reacciones, en el curso de las cuales la molécula es gradualmente desdoblada en oxalacetato a través de la formación de *cis*-aconitato, isocitrato, oxalsuccinato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato y malato. El oxalacetato formado del malato se condensa con acetato, que proviene de la acetil-coenzima A, para constituir nuevamente una molécula de citrato y reanudar así el ciclo. Los pasos oxidativos del ciclo de Krebs, indicados en la figura 5-9, son los que sintetizan ATP a partir del fosfato inorgánico. Para explicar esto es necesario recordar que cuando un átomo de hidrógeno se ioniza pierde un electrón, proceso que también entra en la categoría de las oxidaciones (la ganancia de un electrón corresponde a una reducción). Uno de los hidrógenos reduce el NAD (es decir, DPN^+) y el segundo hidrógeno ionizado pierde un electrón, el cual, por medio de una flavoproteína, la coenzima q (ubiquinona), los citocromos *b*, *c*, *a* y *a*₃, se combina finalmente con el oxígeno molecular para formar una molécula de agua.

Solamente en el caso de la etapa succinato-fumarato el hidrógeno omite el DPN^+ y se combina con la flavoproteína directamente. La figura 5-9 evidencia que en cada cadena respiratoria se forman tres moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Ochoa encontró que por cada tres fosfatos inorgánicos que pasan a ser orgánicos (ATP) se usa una molécula de oxígeno. Esta relación, denominada cociente P/O, constituye una expresión del número de moléculas de ATP que se forma en cada paso del ciclo de Krebs, sitios en los cuales los fosfatos de alta energía son sintetizados. La tabla 5-2 da el número real de moléculas de ATP que se originan en cada etapa oxidativa. Por llevarse a cabo simultáneamente la oxidación y la fosforilación, el proceso recibe el nombre de *fosforilación oxidativa*.

TABLA 5-2. Cociente fósforo/oxígeno en diferentes pasos del ciclo de Krebs

	Cociente P/O en células intactas
Piruvato — Acetil-coenzima A	3
Isocitrato — Succinato	3
α -Cetoglutarato — Succinato	2
Succinato — Fumarato	2
Malato — Oxalacetato	3

El ciclo de Krebs incluye una serie de procesos que llevan a la combustión final de todos los alimentos. Como se ve en la figura 11-9, los ácidos grasos y aminoácidos entran en el ciclo de Krebs como piruvato, por vía de la acetil-coenzima A. Este ciclo es uno de los ejemplos clásicos de la economía de la naturaleza: las siete enzimas que intervienen realizan su función para cualquier tipo de alimento incorporado al organismo.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Baldwin, E.: (1967) *Dynamic aspects of Biochemistry*. 5th ed. Cambridge University Press, London.
- Bernhard, S.: (1968) *The structure and function of enzymes*. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrbäck, K.: (1959-1963) *The enzymes*, 2nd ed., 8 vols., Academic Press, New York.
- Bray, H. G. and White, K.: (1966) *Kinetics and thermodynamics in Biochemistry*. 2nd ed. Academic Press, New York and London.
- Dixon, M. and Webb, E. C.: (1964) *Enzymes*. 2nd ed. Longmans, Green and Co., London.
- Enzyme nomenclature: (1965) *Recommendations of the International Union of Biochemistry*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- George, P. and Rutman, R. J.: (1960) The high energy bond concept. *Progr. Biophys.*, 10:2.
- Griffiths, D. E.: (1965) Oxidative phosphorylation. *Essays in Biochemistry*, 1:91.
- Krebs, H. A.: (1950) The tricarboxylic acid cycle. *Harvey Lect.*, Ser. 44 (1948-1949), p. 165.
- Latner, A. L. and Skillen, A. W.: (1968) *Isoenzymes in Biology and Medicine*. Academic Press, New York.
- Lehninger, A. L.: (1965) *Bioenergetics*. W. A. Benjamin, Inc., New York.
- Mahler, H. R. and Cordes, E. H.: (1966) *Biological Chemistry*. Harper and Row, New York and London.
- Monod, J., Changeux, J. P. and Jacob, F.: (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. molec. Biol.*, 6:306.
- Racker, E.: (1961) Mechanism of synthesis of ATP. *Adv. Enzymol.*, 23:323.
- Roodyn, D. B. (ed.): (1967) *Enzyme Cytology*. Academic Press, New York, London.
- Stadtman, E. R.: (1966) Allosteric regulation of enzyme activity. *Adv. Enzymol.*, 28:41.
- Weyer, E. M. (ed.): (1968) Multiple molecular forms of enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 151, art. 1.
- Watson, J. D.: (1965) *Molecular Biology of the gene*. W. A. Benjamin, Inc., New York.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Koshland, D. E., Jr.: (1960) *Adv. Enzymol.*, 22:45.
2. Yankeelov, J. A., Jr., and Koshland, D. E., Jr.: (1965) *J. biol. Chem.*, 240:1593.
3. Monod, J., Changeux, J. P. and Jacob, F.: (1963) *J. molec. Biol.*, 6:306.
4. Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J. P.: (1965) *J. molec. Biol.*, 12:88.
5. Gerhard, J. C. and Schachman, H. K.: (1965) *Biochemistry*, 4:1054.

TERCERA PARTE

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA CELULA

El progreso extraordinario de la Biología celular en los últimos años ha dependido del desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la célula y de sus componentes moleculares y macromoleculares. En los capítulos que siguen se estudiarán los dos grupos principales de técnicas empleadas en Citología. El primero incluye los métodos de análisis que utilizan el espectro de ondas electromagnéticas, sean éstas radiaciones visibles, ultravioletas, electrones o rayos X. Es muy conveniente un repaso de Física, sobre todo de los capítulos de óptica referentes a la reflexión, refracción, interferencia y difracción de las ondas electromagnéticas. De tal modo, el lector podrá seguir más adecuadamente los fundamentos físicos del conjunto de instrumentos que se han ido creando para analizar la estructura celular y subcelular, hasta llegar al plano de la Biología molecular. En este último sentido se destacará la importancia de la microscopia electrónica y de la difracción de rayos X. El estudiante advertirá que las imágenes proporcionadas por el microscopio óptico, los microscopios de fase y de interferencia, el microscopio de polarización y el microscopio electrónico están basadas en distintos principios físicos. El estudio del microscopio electrónico y de las técnicas empleadas para la preparación de los materiales biológicos es de fundamental importancia en Biología celular.

Esta parte del libro se complementa en el capítulo 7 con una mención sucinta de los principales métodos de análisis citológico y citoquímico empleados en Biología celular. Son tan diversas las técnicas para la observación y experimentación de las células, que rebasan las intenciones de la obra. Sólo se ha tratado de dar algunos ejemplos de los principales métodos para el estudio de la célula viviente, destacando los fundamentos de la fijación y mencionando los mecanismos en que se fundan los métodos de coloración.

En la Citología actual son importantísimas las técnicas histoquímicas y citoquímicas para la identificación y localización de componentes intracelulares. Sin embargo, sólo se darán algunos ejemplos seleccionados, haciendo hincapié, más que en los detalles, en los fundamentos y problemas que pueden solucionarse mediante su empleo. Se deben destacar, sin embargo, las modernas técnicas enzimáticas, la microscopia de fluorescencia, los métodos inmunocitológicos y, en especial, la radioautografía, por la importancia que tienen en Biología celular y en Biología molecular.

6

Instrumentos de análisis de las estructuras biológicas

Al estudiar este capítulo el lector deberá estar familiarizado con los límites y dimensiones que fueron expuestos en el capítulo 1 y con los principios y leyes ópticas en los cuales se basan los microscopios ópticos comunes (fig. 6-1).

La observación de las estructuras biológicas es difícil, debido: 1) a que las células son generalmente de pequeño tamaño, y 2) a que son transparentes a la luz visible. Estas dos propiedades físicas han sido decisivas para el desarrollo de nuevos instrumentos diseñados con el fin de proporcionar una mejor definición de la estructura celular, aumentando por un lado el *poder resolutivo* y contrarrestando por otra parte la transparencia de la célula mediante el aumento del *contraste*.

Poder resolutivo del microscopio

En el microscopio óptico, así como en cualquier otro tipo de microscopio, el poder de resolución, que es la capacidad del instrumento para dar imágenes distintas de puntos situados muy cerca uno del otro en el objeto, depende de la longitud de onda (λ) y de la apertura numérica de la lente objetivo (AN). El límite de resolución, que se define como la distancia mínima que debe existir entre dos puntos para que puedan ser discriminados como tales, es:

$$\text{Límite de resolución} = \frac{0.61 \lambda}{AN} \quad (1)$$

siendo la apertura numérica: $AN = n \cdot \sin \alpha$ (n es el índice de refracción del medio y α el seno del ángulo de apertura). Es importante recordar que el límite de resolución es la inversa del poder resolutivo, de manera que

cuanto mayor sea éste, menor será el límite de resolución.

Puesto que el seno de α no puede exceder de 1, y que el índice de refracción de los mejores materiales ópticos no puede ser superior a 1.6 usando aceite de inmersión, la máxima AN de las lentes es de alrededor de 1.4. Con estos parámetros es fácil calcular a partir de la fórmula (1) que el límite de resolución del microscopio no excede de los 1700 Å (0.17 μ) usando luz monocromática de $\lambda = 4000$ Å (violeta). Con luz blanca, el poder resolutivo es de 2500 Å = 0.25 μ . Como en la fórmula (1) la AN es limitada, resulta evidente que la única manera de incrementar el poder resolutivo (o sea disminuir el límite de resolución) consiste en utilizar longitudes de onda menores. En este caso, sin embargo, las lentes de vidrio ya no son más transparentes y se hace necesario introducir otros medios de refracción. Por ejemplo, con radiación ultravioleta, de 2000 a 3000 Å, se usan lentes de cuarzo u óptica de reflexión y la resolución aumenta de esta forma al doble, llegando a 1000 Å el límite de resolución. Por cálculos similares, un microscopio que use radiación infrarroja de 8000 Å tendría un límite de resolución igual a 0.4 μ .

MÉTODOS PARA AUMENTAR EL CONTRASTE

Microscopio de fase

El ojo es capaz de discriminar diferencias en longitudes de onda (color) y en la intensidad de la luz visible. La mayoría de los componentes celulares son esencialmente transparentes a la región visible del espectro, con excepción de algunos pigmentos, más frecuentes en las células vegetales, que absorben

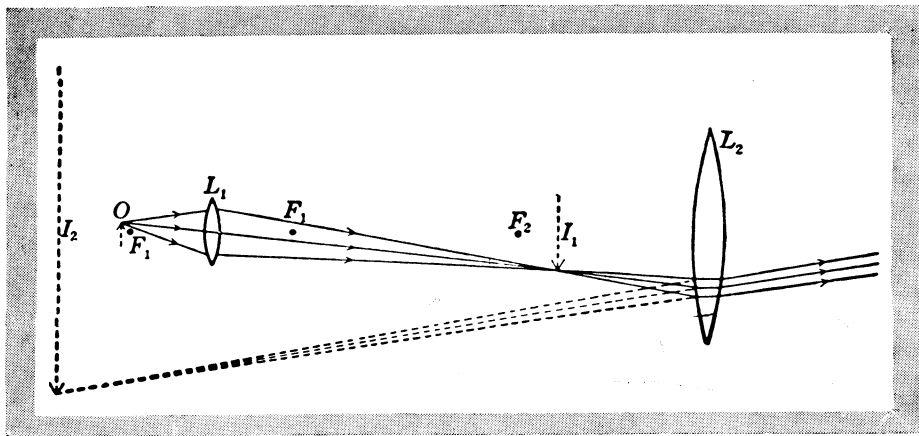


FIG. 6-1. Trayectoria de la luz en el microscopio óptico compuesto. Se representa con L_2 al grupo de lentes del ocular y con L_1 al grupo de lentes del objetivo. El objeto está colocado sobre la platina del microscopio, justo por fuera del foco principal del objetivo (L_1), el cual posee un foco corto. Esta lente produce una imagen real en I_1 , la que se forma dentro del foco principal del ocular (L_2). El ojo, mirando a través del ocular, ve una imagen virtual aumentada (I_2) de la imagen I_1 .

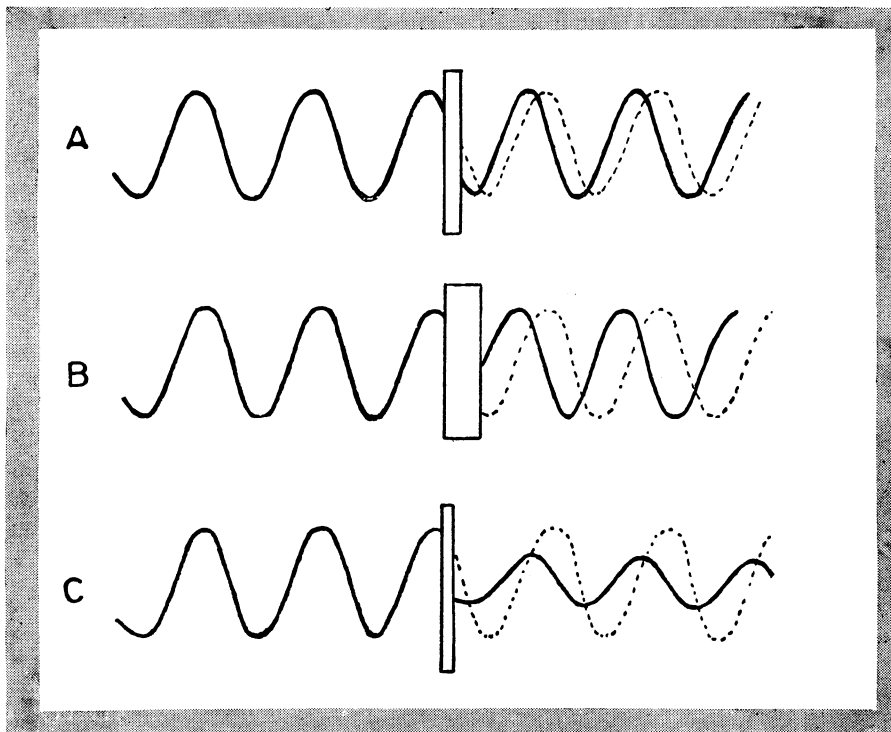


FIG. 6-2. Esquema que revela: A El efecto de un material transparente y no-absorbente de mayor índice de refracción que el medio, el cual introduce un cambio de fase (retardo). B El mismo objeto, pero más grueso, que ocasiona retardo o cambio de fase más pronunciado. C El efecto de un objeto transparente y absorbente, existe un retardo, pero también una disminución en la amplitud (intensidad).

luz a ciertas longitudes de onda (sustancias coloreadas). La baja absorción de luz de la célula viviente se debe a su alto contenido en agua, pero aun después de desecados sus componentes presentan muy escaso contraste. Un medio de contrarrestar esta limitación es emplear colorantes que tiñan selectivamente los diferentes componentes celulares, introduciendo de este modo diversos compuestos que absorben determinadas y específicas longitudes de onda. Sin embargo, las técnicas de coloración tienen el inconveniente de que en la mayoría de los casos no pueden utilizarse en la célula viva. El tejido debe ser fijado, deshidratado, incluido y seccionado antes de su coloración, y todos estos procedimientos son susceptibles de introducir cambios químicos y morfológicos.

En los últimos años se han realizado importantes adelantos en el estudio de las células vivientes por el desarrollo de técnicas ópticas especiales, como la *microscopia de contraste de fase* y la de *interferencia*. Estas técnicas se basan en que, aun cuando las estructuras biológicas son sumamente transparentes a la luz visible, introducen cambios de fase en las radiaciones que las atraviesan. Las diferencias de fase, que resultan de pequeñas diferencias en el índice de refracción y en el espesor de las distintas partes del objeto, pueden ser ahora comprobadas con más claridad.

En la figura 6-2 se indican los efectos de un material transparente (A) y de un material absorbente (C) sobre un rayo de luz. En A, la onda atraviesa un material que tiene un índice de refracción diferente al del medio. Al atravesar el objeto, la amplitud de la onda no cambia, pero la velocidad se altera. Si el índice de refracción en el material es mayor, tiene lugar una *demora* o *retardo*, que también se denomina *cambio de fase*. Después de salir el rayo, la velocidad se restablece, pero el retardo subsiste. Este retardo implica un cambio de fase que puede ser medido en fracciones de longitud de onda. El cambio de fase aumenta en forma proporcional a la diferencia entre los índices de refracción del objeto y del medio, y al grosor del objeto (fig. 6-2, B).

Para entender mejor el microscopio de fase, es necesario analizar primero el comportamiento de un rayo de luz que atraviesa una partícula transparente de pequeño grosor y con índice de refracción muy cercano al del medio que lo rodea, como es el caso de la

célula viviente. Mientras que parte de la luz la atraviesa sin desviarse, manteniendo la misma amplitud y longitud de onda respecto de los rayos que no pasan a través del objeto (onda S en la fig. 6-3, B), la otra parte de la onda se difracta y se desvía (onda D en la figura 6-3, B).

Es interesante recordar que en materiales biológicos la diferencia de fase entre las ondas S y D es de $1/4 \lambda$ aproximadamente (fig. 6-3, B). Los dos rayos (S y D) atraviesan las lentes del objetivo y sufren interferencia. El rayo resultante tendrá una longitud de onda y una amplitud similar al que atraviesa el medio, pero experimentará un pequeño retardo de fase. Éste no es suficiente como para producir un cambio en la amplitud y por tanto no se distingue con el microscopio óptico común, en donde también el fenómeno tiene lugar.

En el microscopio de contraste de fase, desarrollado originariamente por Zernike como un método para probar espejos telescópicos, las pequeñas diferencias de fase son transformadas en diferencias de amplitud (y por consiguiente de intensidad) apreciables por el ojo o la placa fotográfica. En el microscopio de fase, los rayos laterales que pasan a través del objetivo son adelantados o retardados un cuarto de longitud de onda ($1/4 \lambda$) con respecto a los centrales que atraviesan el objeto, por medio de una placa anular que produce dicha variación en el plano focal posterior del objetivo. Además, se coloca en el condensador subyacente un diafragma anular (fig. 6-3). La placa de fase es un disco transparente que contiene un surco anular o una elevación de tamaño y forma tales que coincida con la imagen directa del condensador subyacente. El efecto de fase resulta de la interferencia entre la imagen geométrica directa dada por la parte central del objetivo y la imagen difractada lateral que ha sido retardada o adelantada en $1/4 \lambda$. Si los dos juegos de rayos se suman en contraste brillante o negativo (figura 6-3, D), el objeto aparecerá más brillante que el medio que lo rodea, mientras que cuando el contraste es positivo u oscuro los dos juegos de rayos experimentan una interferencia sustractiva (fig. 6-3, C), siendo la imagen del objeto más oscura que la del medio. De este modo, los pequeños cambios de fase que se producen en el objeto son ampliados y transformados en cambios de amplitud (intensidad). El objeto transparente aparecerá entonces con diversos tonos de gris que dependen del producto entre el espesor del objeto y las diferencias entre los índices de refracción del objeto y del medio. (Para mayores detalles de esta técnica y sus aplicaciones al espectro ultravioleta e infrarrojo, y el uso de luz polarizada, ver 1-6 y la bibliografía general.)

La microscopia de fase se usa en la actualidad como método de rutina en la observación de células y tejidos vivientes. Es realmente extraordinaria la riqueza de detalles

citológicos que pueden observarse en tejidos cortados simplemente y estudiados en líquidos fisiológicos (fig. 2-2). La microscopía de fase es particularmente valiosa en la observación de células cultivadas *in vivo* (figura 10-5). En éstas, usando cinematografía con intervalos, se observan fácilmente los diferen-

tes cambios nucleares y citoplásmicos que tienen lugar durante la división celular, los movimientos celulares, el continuo flujo de mitocondrias, vacuolas de líquido (pinocitosis) y cuerpos de inclusión, la formación de finas expansiones membranas y fibrilares, etcétera.

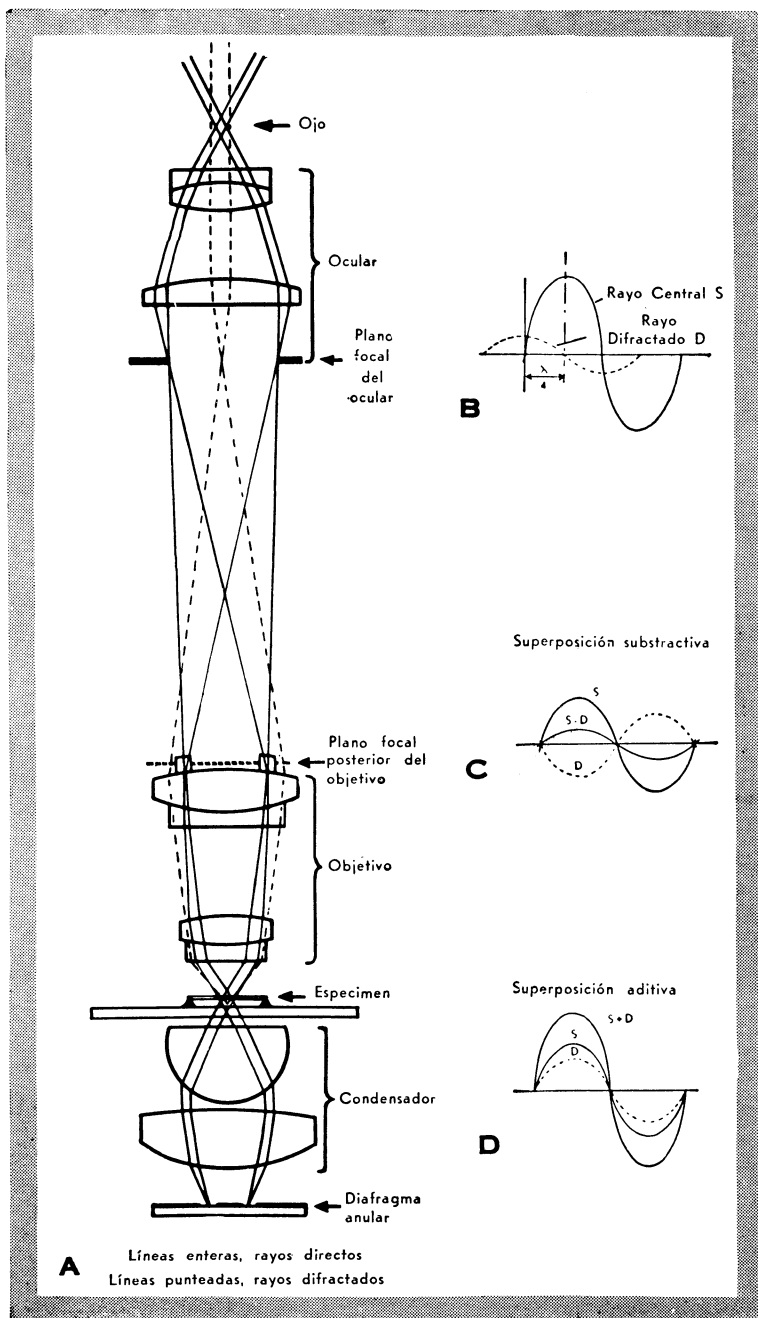


FIG. 6-3. En A se ve el camino de la luz en el microscopio de fase. En B se observa el retardo normal de $1/4$ de longitud de onda de la luz difractada por el objeto y su diferencia de fase con la luz que pasa a través del medio que lo rodea. Por intervención de la óptica de fase, las dos ondas se superponen para sumarse una con la otra en *contraste de fase brillante*, como se observa en D, o para restarse una de la otra como en el *contraste de fase oscuro* evidenciado en C. (De American Optical Co.)

Microscopio de interferencia

El microscopio de interferencia se basa en principios similares a los del microscopio de fase, pero tiene la ventaja de dar resultados cuantitativos. Con este instrumento es posible determinar las diferencias ópticas de fase para las diversas estructuras celulares y en consecuencia medir su peso seco. Más aún, es posible descubrir pequeños cambios en el índice de refracción, mientras que el microscopio de fase sólo revela las discontinuidades más notables. Además, las variaciones de fase se pueden reflejar en cambios de color tan acentuados que una célula viviente es susceptible de parecerse a una preparación coloreada.

La figura 6-4 constituye una representación esquemática de un sistema de microscopía de interferencia, en el cual la luz emitida por una única fuente se divide en dos haces, uno de los cuales es enviado a través del objeto y el otro pasa alrededor de éste. Los dos haces luego se recombinan e interfieren entre sí como en el caso de la microscopía de fase. El haz que atraviesa el objeto se retarda, es decir, experimenta un cambio en su fase, en comparación con el haz directo. Como en el caso de la microscopía de polarización (véase más adelante el retardo γ depende del espesor (t) y de la diferencia entre el índice de refracción del objeto (n_o) y el del medio que lo rodea (n_m):

$$n_o - n_m = \frac{\gamma}{t} \quad (2)$$

(si se conoce n_m , n_o puede ser determinado).

Con este instrumento es posible realizar medidas del peso seco del objeto, debido a que el peso está relacionado con el índice de refracción. Cuando éste

es medido en agua, se puede aplicar la siguiente relación:

$$C_o = \frac{100 \, n_o - n_w}{X} \quad (3)$$

donde C_o es el porcentaje de concentración del material seco en el objeto; n_w , el índice de refracción del agua; X , una constante que equivale a $100 \, \alpha$ (siendo α el incremento del índice de refracción específico del material en solución); X es de alrededor de 0,18 para la mayoría de las sustancias de la célula, proteínas, lipoproteínas y ácidos nucleicos.¹⁰

TABLA 6-1. Medida de la materia seca (C_o) en células

(De Mitchison y Swann)

	$n_o - n_w$	$C_o = \frac{100 (n_o - n_w)}{x}$ para $x = 0,165$
Citoplasma	0,036	25,5
Núcleo	0,021	16,4

La microinterferometría permite determinar simultáneamente el espesor del objeto (t), la concentración de materia seca y el contenido de agua, midiendo la diferencia óptica de fase en dos medios cuyos índices de refracción son conocidos. Un ejemplo de la aplicación de este método es el estudio del huevo del erizo de mar como se ilustra en la tabla 6-1. Las mediciones demuestran que el porcentaje de concentración de materia seca es mucho ma-

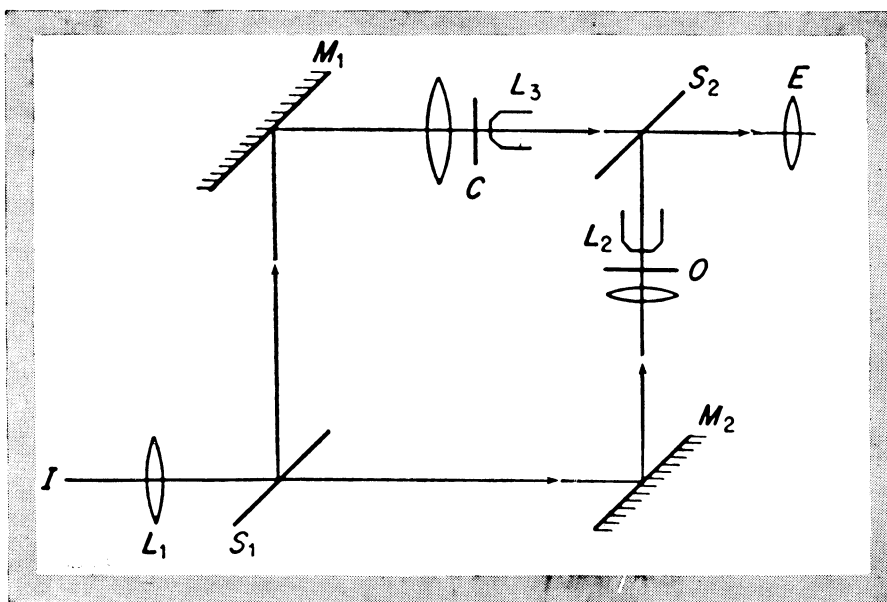


FIG. 6-4. Representación esquemática de un sistema "ideal" de microscopio de interferencias: S_1 y S_2 , superficies de espejos semirreflectores; M_1 y M_2 , superficies de espejos reflectores; L_2 y L_3 , lentes del microscopio; O , lente objetivo; C , lente de comparación. (De R. Barer.)

yor en el núcleo (en este estado del desarrollo celular) que en el citoplasma.

La figura 6-5 pone de manifiesto la notable imagen tridimensional de células en división, como se la obtiene con el sistema de contraste de interferencia diferencial según Nomarski.¹¹

Microscopia de fondo oscuro

La microscopia de fondo oscuro, también denominada *ultramicroscopia*, está basada en el hecho de que la luz se dispersa en los límites entre los diversos materiales que poseen diferentes índices de refracción. El instrumento consiste en un microscopio en el cual el condensador común se halla reemplazado por uno que ilumina el objeto oblicuamente. Con el condensador de campo oscuro no entra luz directa en el objetivo y por tanto el objeto aparece brillante debido a la dispersión de la luz, mientras que el fondo permanece oscuro. Por ejemplo, una célula en cultivo de tejido puede mostrar brillante el nucleólo, la membrana nuclear, las mitocondrias y las gotas de lípidos destacándose sobre el fondo oscuro del citoplasma. Por medio de este instrumento pueden descubrirse, pero no resolverse, estructuras menores que las que se visualizan con el microscopio óptico común.

Microscopia de polarización

Este método se fundamenta en el comportamiento que tienen ciertos componentes de la célula y tejidos, cuando son observados con luz polarizada. Si el material es *isotrópico*, la propagación de la luz polarizada a su través ocurre con la misma velocidad, cualquiera que sea la dirección del plano de incidencia. Estas sustancias o estructuras se caracterizan por tener el mismo *índice de refracción* en todas direcciones. En cambio, en un material *anisótropo*, la velocidad de propagación de la luz polarizada difiere según la dirección que se considere. Un material con dichas características también se denomina *birrefringente*, porque presenta dos índices de refracción distintos que corresponden a las diferentes velocidades de transmisión.

La birrefringencia puede expresarse cuantitativamente por la diferencia que existe entre los dos índices de refracción ($N_e - N_o$) que están asociados con el rayo de mayor y menor velocidad. En la práctica, se mide con el microscopio de polarización el retardo ($\sqrt{}$)—expresado en $m\mu$ o en fracción de longitud de onda (λ)— que experimenta la luz en un plano con respecto a la velocidad que presenta en otro plano perpendicular al ante-

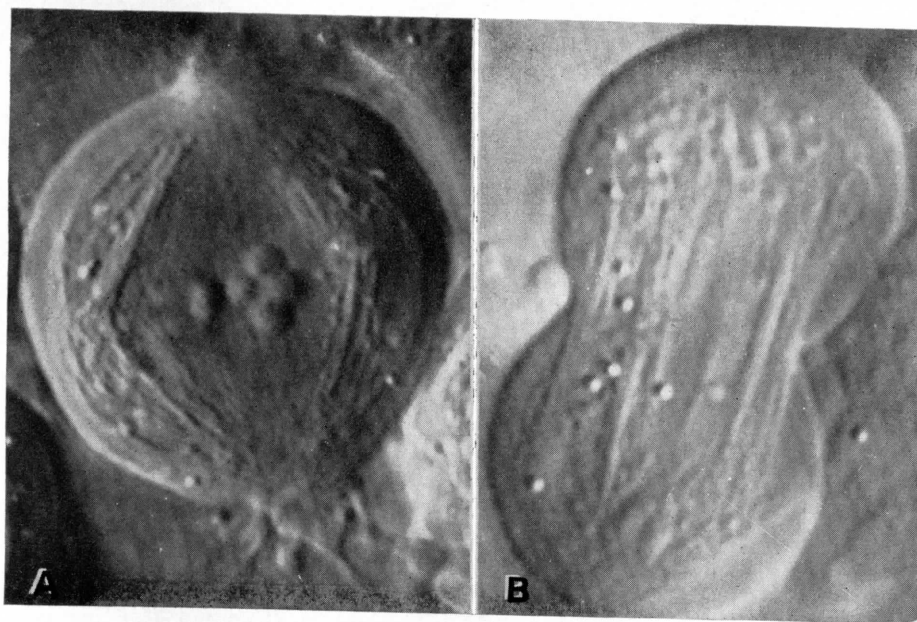


FIG. 6-5. Metafase y anafase en una meiosis de insecto (*Nephrotoma sotalis*) observadas con el microscopio de interferencia de Nomarski. (Cortesía de F. Muckenthaler.)

rior. El retardo depende del espesor del espécimen (d), de manera que:

$$\text{Birrefringencia } (\beta) = N_e - N_o = \frac{\sqrt{-}}{d} \quad (4)$$

La medida del retardo se lleva a cabo con el uso de diversos compensadores que se introducen en el sistema óptico. La birrefringencia de los materiales biológicos es generalmente muy pequeña, del orden de 0.01 a 0.001 μ .

El microscopio de *polarización* difiere de los convencionales por el agregado de dos elementos de polarización: el *polarizador* y el *analizador*, que pueden estar hechos de una hoja de *polaroid* o por prismas de Nicol de calcita. El *polarizador* se monta debajo del condensador y envía luz polarizada en un plano al objeto. Un sistema similar, el *analizador*, se coloca por encima de las lentes del objetivo. Cuando el analizador se rota alrededor de los 360°, el campo de visión aparece brillante y oscuro, alternativamente, cada 180° de rotación. Las dos posiciones de máxima transmisión de luz se obtienen cuando el analizador queda paralelo al polarizador. En la posición cruzada no hay transmi-

sión de luz polarizada. Si en esta última condición se coloca un espécimen birrefringente, el plano de polarización será desviado de acuerdo con el retardo introducido por el objeto. El control con luz polarizada consiste en rotar al espécimen y encontrar los puntos de brillo máximo o mínimo. El brillo máximo se consigue cuando el eje del objeto hace un ángulo de $\pm 45^\circ$ con los ejes del polarizador y analizador (fig. 6-6).

En la mayoría de las fibras biológicas, la birrefringencia es *uniáxica* y puede ser *positiva*, si el índice de refracción a lo largo del eje de la fibra es mayor que en el plano perpendicular a aquél, y *negativa* en el caso contrario. La determinación del signo se realiza interponiendo un material birrefringente con ejes cuya mayor o menor velocidad es conocida. Con el perfeccionamiento de los métodos de microscopía de polarización actualmente disponibles, se pueden medir retardos del orden de 0.1 $\mu\mu$ (1 Å) con una resolución de 0.3 μ (fig. 13-5).

La birrefringencia depende de propiedades estructurales, que son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz, por lo cual el microscopio de polarización es un medio para analizar indirectamen-

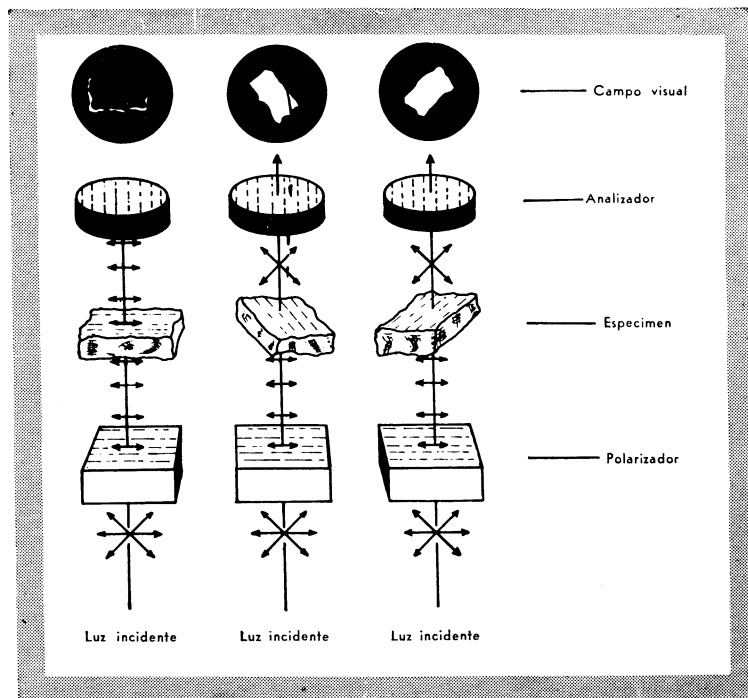


FIG. 6-6. Dibujo esquemático que muestra las variaciones en brillo y oscuridad de un objeto anisótropo cuando es colocado entre un polarizador y un analizador cruzado y rotado $\pm 45^\circ$. (De G. B. Wilson y J. H. Morrison.)

te la ultraestructura de la célula. Este método, que fue el único por casi un siglo, actualmente ha perdido gran parte de su vigencia en favor del microscopio electrónico. Sin embargo, es muy importante saber que en los sistemas biológicos la birrefringencia depende de diferentes propiedades intrínsecas que están relacionadas con su organización molecular y macromolecular. Los principales tipos de birrefringencia son:

Cristalina o birrefringencia intrínseca, que se encuentra en los sistemas donde las uniones entre las moléculas o iones poseen una disposición regularmente asimétrica. Esta propiedad es independiente del índice de refracción del medio. Estructuras compuestas por proteínas o lípidos pueden mostrar cierto grado de birrefringencia cristalina, que es uniaxial positiva. Por otro lado, las fibras de nucleoproteínas tienen una birrefringencia uniaxial negativa.

Birrefringencia de forma, se produce cuando las partículas submicroscópicas asimétricas se orientan en un medio de diferente índice de refracción. En este caso, la birrefringencia se modifica cuando el índice de refracción del medio varía (fig. 6-7).

De acuerdo con la teoría de Wiener, la birrefringencia es positiva cuando las partículas son cilindros con sus ejes orientados paralelamente al eje de la fibra, y negativa, si las partículas tienen forma de placas con sus ejes orientados perpendicularmente al eje de la fibra.

Sumergiendo una estructura en medios de diferentes índices de refracción, pueden construirse curvas donde la birrefringencia se relaciona con los índices de refracción. La posición del punto mínimo de estas curvas indica si la birrefringencia de forma es pura o, como generalmente ocurre, combinada en mayor o menor grado con la birrefringencia cristalina (fig. 6-7).

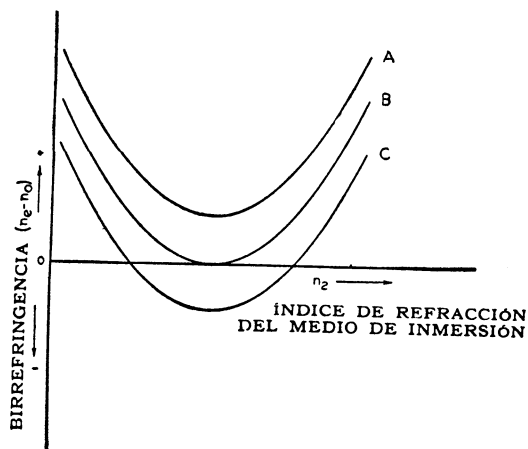


FIG. 6-7. Método para determinar el signo y la proporción relativa de birrefringencia de forma y birrefringencia cristalina mediante la técnica de inmersión. A Indica birrefringencia cristalina y de forma, ambas positivas. B Señala birrefringencia de forma positiva sin birrefringencia cristalina. C Revela birrefringencia de forma positiva y birrefringencia cristalina negativa. (De Schmitt.)

Birrefringencia fotoelástica, que manifiestan ciertas estructuras isotrópicas cuando están sometidas a una tensión o presión. Es importante en el músculo y durante el desarrollo del embrión.

Dicroísmo, que tiene lugar cuando la absorción de una determinada longitud de onda de la luz polarizada cambia con la orientación del objeto. En el dicroísmo, los cambios son de amplitud, esto es, en la intensidad de la luz transmitida. El dicroísmo raramente se encuentra en estructuras biológicas con luz visible. Sin embargo, puede inducirse en tejidos con algunos procedimientos de coloración; colorantes orgánicos como el rojo Congo o la tionina producen dicroísmo en ciertas estructuras debido a la orientación especial de las moléculas del colorante. La precipitación de partículas coloidales metálicas dentro de una estructura orientada también puede introducir dicroísmo. Para más detalles sobre estas técnicas véase 12, 13.

Microscopia electrónica

El microscopio electrónico es el único instrumento que permite conocer directamente la ultraestructura biológica, puesto que posee un poder de resolución mucho mayor que el del microscopio óptico. Utiliza la propiedad que tienen los haces de electrones de ser desviados por un campo electrostático o electromagnético, en la misma forma que un rayo de luz es refractado al atravesar una lente. Si se coloca un filamento en un tubo al vacío y luego es calentado, ese filamento emite electrones que pueden ser acelerados por medio de una diferencia de potencial eléctrico. En estas condiciones el haz de electrones tiende a seguir una trayectoria rectilínea y posee propiedades similares a las de la luz. Al igual que ésta, manifiesta un carácter vibratorio y corpuscular, pero la longitud de onda es mucho menor ($\lambda = 0.05 \text{ \AA}$ para los electrones, en oposición a los $5500 \text{ \AA}$ de la luz).

En el microscopio electrónico, el filamento o cátodo emite el haz de electrones. Por medio de una bobina electromagnética, que hace las funciones de condensador, los electrones se concentran en el plano donde se coloca el objeto. La segunda bobina funciona como una lente objetivo y da una imagen agrandada del objeto. Ésta es recibida por una tercera "lente" magnética que actúa como ocular o lente de proyección, la cual aumenta la imagen que proviene del objetivo. La imagen final se ve sobre una pantalla fluorescente o con una placa fotográfica (fig. 6-8).

A pesar de las aparentes semejanzas mostradas en la figura 6-8 existen grandes diferencias entre el microscopio óptico y el electrónico, algunas de las cuales se refieren al

mecanismo de formación de las imágenes. Mientras que en el microscopio óptico, ésta depende principalmente de la desigual absorción de la luz en diferentes zonas del objeto, en el microscopio electrónico la formación de la imagen se debe principalmente a la *dispersión de electrones*. A menudo, los electrones que chocan con los núcleos de los átomos del objeto son dispersados en forma elástica de manera tal que caen fuera de la apertura de la lente objetivo, y la imagen observada en la pantalla fluorescente resulta, así, de la ausencia de esos electrones que han sido detenidos por la apertura. La dispersión puede, también, ser consecuencia de colisiones múltiples que disminuyen la energía de los electrones que pasan. En este caso se producen efectos cromáticos. La dispersión de electrones está en función del espesor y densidad molecular del objeto y, en especial, del número atómico de los átomos que entran en su composición. A mayor número atómico, mayor dispersión. Gran parte de los átomos que componen las estructuras biológicas, como C, H, O, N, son de bajo número atómico y contribuyen poco a la formación de la ima-

gen. Por esta razón, como veremos más adelante, se deben agregar átomos pesados a la estructura molecular.

La ventaja principal del microscopio electrónico reside en que su poder de resolución es mucho mayor, aunque éste depende de los mismos parámetros que en el microscopio óptico. La longitud de onda del haz de electrones depende del voltaje o potencial de aceleración de los electrones y puede ser calculada con la fórmula de De Broglie:

$$\lambda = \frac{12.2}{\sqrt{v}} \quad (5)$$

Por ejemplo, en uno de los modelos corrientes de microscopio electrónico $V = 50,000$ v y $\lambda = 0.0535$ Å.

Debido a la gran aberración de las lentes magnéticas, la apertura numérica de los microscopios electrónicos es mucho menor que en el microscopio óptico y el límite de resolución puede calcularse entre 3 y 5 Å. En la práctica, con material biológico, el límite se encuentra alrededor de los 10 Å (fig. 1-2).

El aumento en el microscopio óptico se debe principalmente al objetivo, que llega a

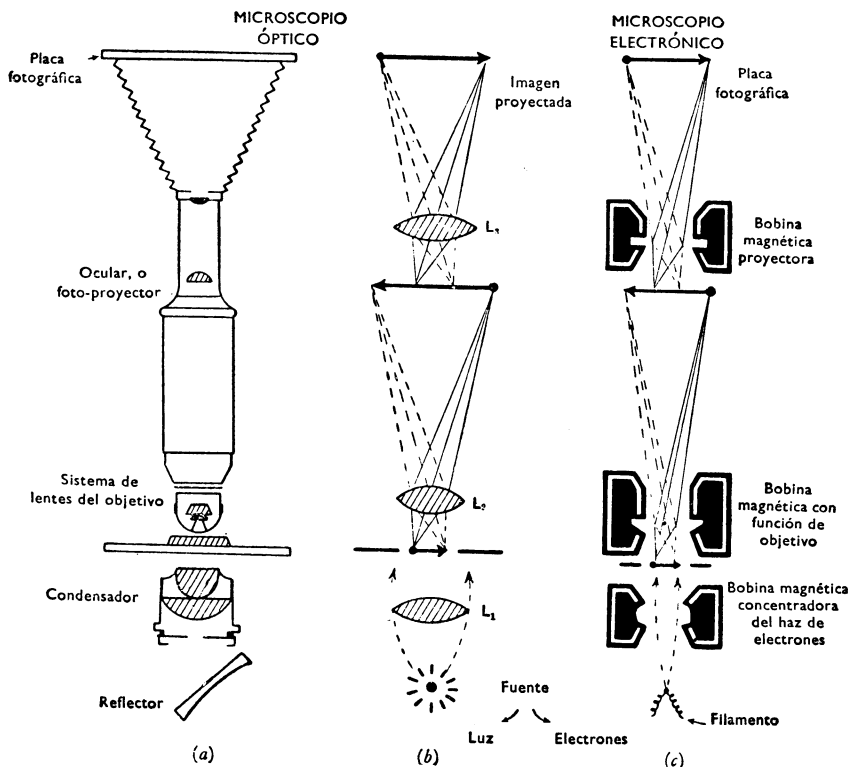


FIG. 6-8. Comparación entre el microscopio óptico y el microscopio electrónico. (De G. Thompson.)

un máximo de 100 a 120 $\times$. El ocular aumenta esta imagen entre 5 y 15 veces. De este modo se llega a un incremento útil del orden de 500 a 1500 $\times$. En el microscopio electrónico, el poder de resolución es tan alto que la imagen obtenida del objetivo puede aumentarse en proporción mucho mayor. Así, con un aumento inicial del objetivo de 100 $\times$ puede ampliarse la imagen 200 veces con la bobina proyectora, lo que equivale a un aumento total de 20,000 $\times$.

En los instrumentos más recientes se obtiene un amplio grado de aumento mediante la introducción de una lente intermedia, con la cual se logran aumentos directos de 160,000 $\times$, mientras que los negativos pueden aumentarse fotográficamente hasta 1,000,000 y más, según la resolución alcanzada (fig. 11-5).

Preparación del material biológico para microscopia electrónica

Por su extraordinario poder de resolución, el microscopio electrónico es un instrumento ideal para el estudio de la estructura submicroscópica de la célula. Sin embargo, su uso está reducido por una serie de dificultades técnicas y de limitaciones. Una de ellas se debe al escaso poder de penetración que tienen los electrones. Si el espesor del material excede de 5000 Å (0.5 μ), la opacidad es

casi total. El objeto debe depositarse sobre una película extremadamente fina (de 75 a 150 Å de espesor) de colodión, carbón, etcétera, que actúa como material de sostén y que a su vez está apoyada sobre una fina grilla de metal. Otra limitación proviene del hecho de que el espécimen debe deshidratarse para ser colocado en el vacío. Ello hace casi imposible el estudio de células en estado vivo. Todas estas dificultades han podido resolverse parcialmente permitiendo, aunque en casos limitados, la observación de especímenes vivos mediante el microscopio electrónico.¹⁴

Las técnicas de preparación de los especímenes varían considerablemente. En Biología existen dos clases principales de preparación: suspensiones de pequeñas partículas y objetos gruesos. Al estudiar suspensiones de partículas, como virus y macromoléculas, una de las dificultades proviene de la tendencia que tienen las partículas a amontonarse entre sí durante la desecación sobre la película de sostén. Pueden obtenerse pequeñas gotas por medio de cierto tipo de atomizador.¹⁵ También pueden producirse gotas submicroscópicas transformando la suspensión en un aerosol (coloide de líquido en aire) y luego depositando las partículas cargadas por medios electrostáticos sobre las grillas.¹⁶

Un método importante para el estudio de

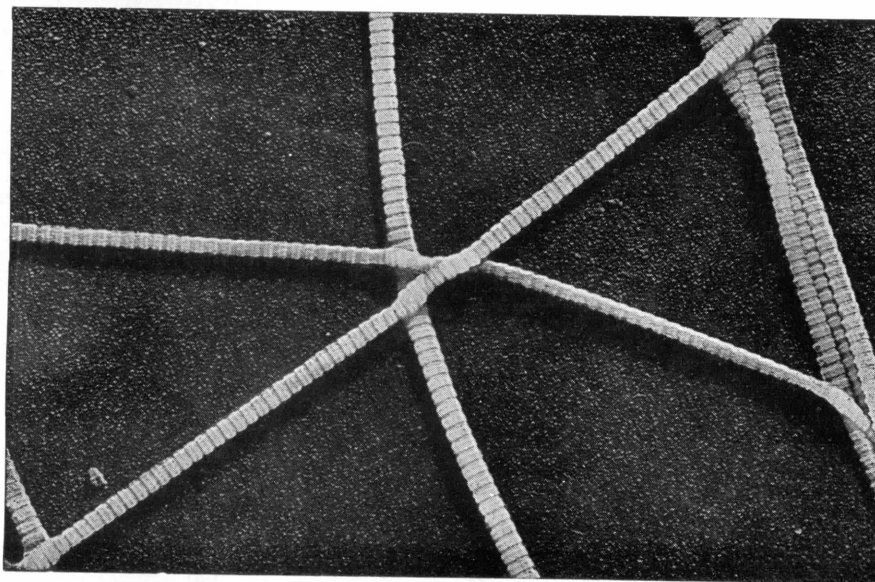


FIG. 6-9. Fotomicrografía electrónica de fibras colágenas de piel humana, sombreadas con cromo por la técnica de evaporación. Se ven estriaciones con un período de 640 Å. 28,000 $\times$. (Cortesía de J. Gross.)

macromoléculas es la denominada técnica de monocapas de Kleinschmidt,¹⁷ en la cual las macromoléculas se extienden sobre una interfase aire-agua antes de ser recogidas sobre una película. Este procedimiento ha dado excelentes resultados en la demostración de moléculas de ADN y ARN de distintos orígenes y tipos.¹⁸ (Fig. 4-15.)

Los especímenes gruesos son susceptibles de ser desintegrados por medios mecánicos, como la homogeneización, ondas sonoras o supersónicas, etcétera. El material es dividido por estos medios a lo largo de sus planos de clivaje en fragmentos, suficientemente finos como para que sean en parte transparentes a los haces de electrones.

En la denominada técnica de *congelación-grabado*, los especímenes son congelados en nitrógeno líquido, fracturados y sus superficies puestas de manifiesto mediante el sombreado con platino o la confección de réplicas con carbono depositado en vacío sobre dichas superficies. Esta técnica ha dado interesantes resultados en el estudio de los cloroplastos (fig. 12-9).

Ultramicrotomía. El estudio de células y tejidos se logra también con el uso de *cortes finos*. La técnica es esencialmente similar a la que se emplea en preparaciones para el microscopio óptico, pero sus requisitos son mucho más críticos. Para cortar un tejido, éste debe previamente *fijarse e incluirse*. El problema de la fijación será tratado en el capítulo 7. La necesidad de realizar cortes ultrafinos ha conducido al uso de medios de inclusión de considerable dureza. Los más usados son los monómeros acrílicos o las resinas de epoxi, que impregnan los tejidos y luego se polimerizan por medio de catalizadores apropiados. Un medio hidrosoluble de glicol-metacrilato ha sido desarrollado para estudios citoquímicos, permitiendo la extracción selectiva de sustancias y la acción de diferentes enzimas.¹⁹

En los últimos años se perfeccionaron considerablemente los métodos de *corte*, construyéndose diversos micrótomos que tienen un avance térmico o mecánico. Con ambos tipos, los cortes más finos que pueden realizarse están en el orden de los 200 Å. Los factores que influyen aparentemente en la limitación son la inclusión apropiada y el filo de la cuchilla. En la actualidad se emplean generalmente las cuchillas de vidrio o diamante. Es posible asimismo realizar cortes ultrafinos a

baja temperatura en material incluido simplemente en gelatina.²⁰ (Para una revisión completa de técnicas microscópicas electrónicas, véase Sjöstrand, 1967.)

Métodos para intensificar el contraste. Ciertos materiales biológicos, como finas membranas, filamentos o macromoléculas (de 100 Å o menos de diámetro), tienen un poder muy pequeño de dispersión electrónica debido a que son uniformemente delgados y están compuestos por átomos livianos. Se han utilizado métodos que tienden a corregir esa dificultad aumentando el contraste y demostrando detalles más finos de la superficie de los objetos. Una técnica de éstas, denominada de sombreado, consiste en colocar el espécimen dentro de una cámara de vacío y en evaporar metales pesados como cromo, paladio, platino o uranio, depositándolos en un ángulo determinado, a partir de un filamento incandescente.²¹ De esta manera, el material se deposita sobre un lado de la superficie de las partículas del espécimen, mientras que del otro lado se produce una sombra cuya longitud permite calcular el espesor de dichas partículas. Las fotomicrografías de esos especímenes presentan un aspecto tridimensional que normalmente no se produce (fig. 6-9).

Una de las técnicas más recientes e importantes en el estudio de los virus y macromoléculas es el de la "coloración negativa", en el cual el espécimen es embebido en una gota de material denso como el fosfotungstato. Éste penetra en todos los espacios vacíos existentes entre las macromoléculas, que aparecen muy bien limitadas en contraste negativo. Con dicha técnica se determinó el número de moléculas proteicas (capsómeras) de diferentes virus y se realizaron observaciones interesantes en algunas estructuras celulares. La coloración negativa puede ser aplicada a pequeñas proteínas globulares que oscilen entre 10,000 y 40,000 Daltons de peso molecular, pero en estos casos sólo es posible determinar la forma general y el tamaño de la molécula.²³

El empleo de sustancias que contienen átomos pesados, como osmio, uranio y plomo, permite obtener un aumento positivo del contraste de las estructuras biológicas. En ciertas condiciones, estas sustancias actúan como colorantes electrónicos, comparables a los colorantes histológicos, al combinarse selectivamente con determinadas regiones del espécimen. A lo largo del libro mencionaremos

ejemplos de coloración electrónica, algunos de los cuales tienen valor citoquímico; por ejemplo, el método propuesto para determinar la secuencia de bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos usando reactivos que se ligan a ellas y constituyen productos de adición.²⁴

Difracción de rayos X

Esta técnica se basa en la propiedad que poseen las radiaciones de difractarse cuando se encuentran con pequeños obstáculos. Si un rayo de luz blanca (λ término medio 0.5μ) incide sobre un retículo de difracción que tenga 1000 líneas por milímetro (1μ de espacio), se difractará dando las distintas bandas del espectro. Cuando la longitud de onda de la luz se conoce, a partir de los ángulos de difracción pueden calcularse los espacios del retículo. Este tipo de enrejado sería muy amplio para los rayos X y con él no se produciría difracción.

Laue sugirió que redes de difracción de dimensiones mucho más pequeñas, como los cristales, serían necesarias para la difracción de los rayos X. Los átomos, iones o moléculas

en los cristales constituyen verdaderos enrejados de dimensiones moleculares capaces de difractar radiaciones de esa longitud de onda (fig. 1-2). Esta técnica ha tenido su máxima aplicación en el estudio de los cristales orgánicos e inorgánicos, en los cuales es posible determinar las relaciones espaciales precisas entre los átomos constituyentes. Un análisis de las moléculas biológicas complejas —como las proteínas y los ácidos nucleicos— es mucho más dificultoso, por el gran número de átomos que componen una sola molécula y las irregularidades arquitectónicas tridimensionales, característica que poseen la mayoría de estas moléculas grandes y complejas (figura 6-10). Sin embargo, como se vio en el capítulo 4, esta configuración de las moléculas es de tal importancia para el estudio de la función biológica, que Pauling, Perutz, Kendrew, Wilkins y otros llevaron a cabo muchos trabajos para dilucidarla. El estudio de la estructura molecular de la hemoglobina, mioglobina, ADN, colágeno, etcétera, ha sido de importancia fundamental para el reciente desarrollo de la Biología molecular.

La técnica de difracción de rayos X, consiste esencialmente en hacer atravesar un haz

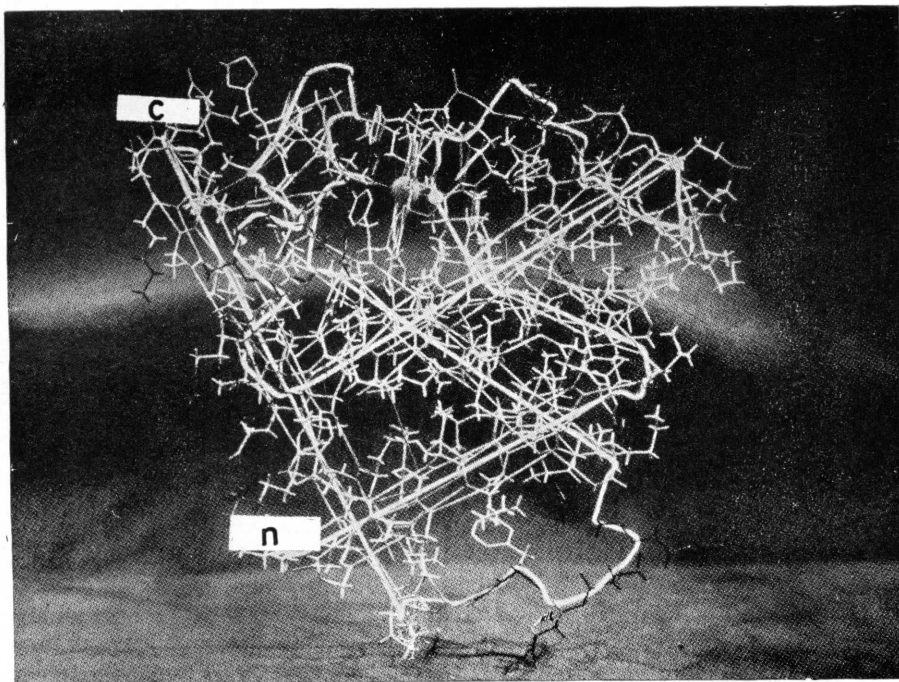


FIG. 6-10. *Modelo de la molécula de mioglobina.* La cuerda blanca representa a la cadena polipeptídica. La molécula de hierro está indicada por una esfera gris. C y N son los dos extremos de la molécula proteica. (De J. C. Kendrew.)

fino de rayos X sobre el material que será analizado y colocar detrás una placa fotográfica que recoge el espectrograma. Sobre éste pueden aparecer una serie de manchas concéntricas o bandas, que resultan de la interferencia entre los diferentes rayos difractados. La distancia entre estas manchas y el centro del espectrograma, depende de la separación que existe entre las unidades repetidas regularmente o *periodos de identidad* del espécimen que produce la difracción. Cuanto menor es el ángulo de difracción, mayor es la distancia entre las unidades repetidas, y cuanto más agudas son las bandas, más regulares serán los espacios (fig. 6-11).

Una estructura cristalina puede considerarse como un enrejado tridimensional en el cual los átomos están distribuidos regularmente a lo largo de los tres ejes principales. La denominada *unidad celular* es un paralelepípedo sólido que representa las mínimas unidades repetidas a lo largo del cristal. En la práctica es más simple pensar que el cristal está constituido por conjuntos de enrejados superpuestos como se indica en la figura 6-12. En ésta, d es el espacio que existe entre los

planos de difracción y θ el ángulo de incidencia.

De acuerdo con la ley de Bragg, la distancia d puede calcularse por la siguiente fórmula:

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad (6)$$

en el cual n corresponde al orden de difracción, λ es la longitud de onda y θ el ángulo de incidencia.

Sabiendo el ángulo de incidencia de una mancha definida en el espectrograma, y la longitud de onda, puede calcularse el espacio que produce la difracción. La longitud de onda que se usa en difracción con más frecuencia es la de la línea $K\alpha$ del cobre (1.54 Å).

El grado de orientación de los especímenes biológicos (por ejemplo, colágeno, queratina, músculo, mielina) se pone de manifiesto por las características de los espectrogramas. Cuando las partículas no están orientadas, se producen anillos concéntricos; la orientación de las fibras ocasiona generalmente arcos o semilunas, mientras que una orientación perfecta (como los cristales) da lugar a manchas

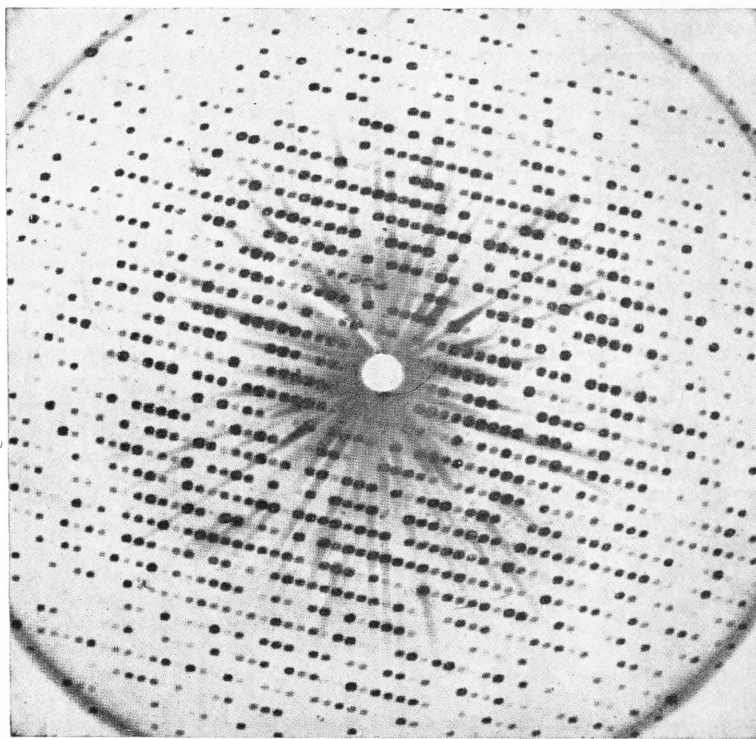


FIG. 6-11. Esquema de difracción de rayos X de un cristal de mioglobina. (De J. C. Kendrew.)

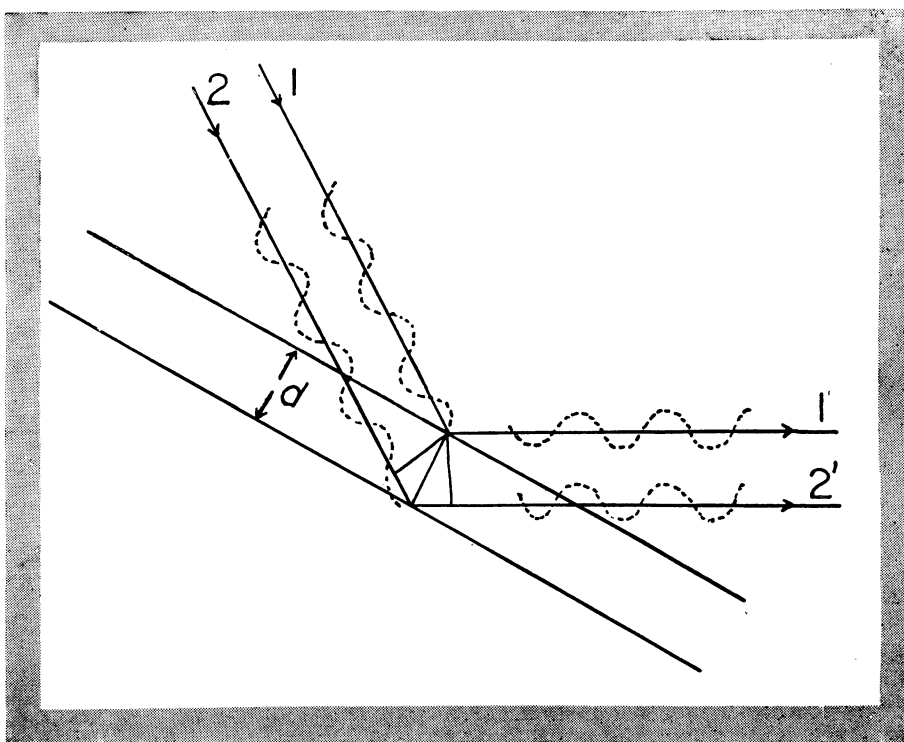


FIG. 6-12. Esquema del efecto de un haz de rayos X incidente sobre dos planos paralelos de un retículo cristalino, separados por una distancia d . Los rayos 1 y 2 incidentes forman un ángulo con aquellos planos y producen dos rayos secundarios o difractados 1' y 2'. Simples consideraciones geométricas permiten deducir la ley de Bragg ($n\lambda = 2d \text{ seno } \theta$) y calcular la distancia d o período de identidad.

puntiformes (fig. 6-11). En general, con cadenas proteicas orientadas, como las que caracterizan a muchas fibras biológicas, los puntos ecuatoriales indican la separación que existe entre las cadenas individuales; los puntos meridionales, en ciertos casos, representan la distancia entre los residuos de aminoácidos.

Con los métodos más refinados de análisis con rayos X se puede calcular, no sólo la distancia entre las unidades celulares, sino también el poder de dispersión de los átomos individuales. Existe cierta semejanza con el microscopio electrónico por el hecho de que en éste la imagen está relacionada con el número atómico, pero aquí la densidad electrónica (número de electrones) de los átomos es el factor más importante. También en este caso se pueden introducir átomos pesados, que sirven como marcas para la reconstrucción de las moléculas. Ello se realiza por medio de un proceso muy complejo que implica la representación gráfica de la densidad electrónica y la síntesis de Fourier de todas las ondas u órdenes de difracción que lo componen. De esta síntesis matemática puede construirse una representación tridimensional del objeto y el modelo de la molécula completa (fig. 6-10).

La difracción de rayos X es uno de los métodos

más importantes en Biología molecular y Ultraestructura, porque permite determinar la orientación de las moléculas, medir con exactitud la distancia que las separa y aun reconocer su organización atómica.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bennet, H. S.: (1948) The microscopical investigation of biological material with polarized light. In: *Handbook of microscopical technique*, 3rd ed. (McClung, C. E., ed.) Paul H. Hoeber, New York.
- Chambers, R. and Chambers, E.: (1961) *Explorations into the nature of the living cell*, parts I and III. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Engström, A. and Finean, J. B.: (1958) *Biological ultrastructure*. Academic Press, New York.
- Kendrew, J. C.: (1963) Myoglobin and the structure of proteins. *Science*, 139:1259.
- Kopac, M. J.: (1959) Micrurgical studies on living cells. In: *The cell*, vol. 1, p. 161. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Oster, G.: (1956) X-ray diffraction and scattering. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 2, p. 441. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
- Osterberg, H.: (1955) Phase and interference microscopy. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 1, p. 378. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.

- Pease, D. C.: (1960) *Histological techniques for electron microscopy*. Academic Press, New York.
- Ruch, F.: (1956) Birefringence and dichroism of cells and tissues. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 149. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
- Shillaber, C. P.: (1959) *Photomicrography in theory and practice*. 5th printing. John Wiley & Sons, New York.
- Sjöstrand, F. S.: (1967) *Electron microscopy of cells and tissues*. Academic Press Inc., New York.
- Wischnitzer, S.: (1967) Current techniques in biomedical electron microscopy. *Int. Rev. Cytol.*, 22:1.
11. Nomarski, G.: (1955) *J. Physiol. Radium*, Paris. 16:95.
12. Schmidt, W. J.: (1937) *Die Doppelbrechung von Karioplasma, Zytoplasma und Metaplasma*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
13. Frey-Wyssling, A.: (1953) *Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives*. Elsevier Pub. Co., New York.
14. Pease, R. F. W. et al.: (1966) Electron microscopy of living insects. *Science*, 154:1185.
15. Backus, R. C. and Williams, R. C.: (1950) *J. appl. Physiol.*, 21:2.
16. De Robertis, E., Franchi, C. M. and Podolsky, M.: (1953) *Biochim. biophys. Acta*, 11:507.
17. Kleinschmidt, A. E., Lang, D., Yacherts, D. and Zahn, R. K.: (1962) *Biochim. biophys. Acta*, 61:857.
18. Granboulan, N. K., Scherrer and Franklin R. M.: (1967) *2nd Int. Symp. on Medical and Applied virology*. (Ed. M. Saunders and E. H. Lennette.) Warren H. Green St. Louis, Mo., p. 366.
19. Leduc, E. H. and Bernhard, W. J.: (1967) *Ultrastruct. Res.*, 19:196.
20. Bernhard, W.: (1966) *6nd Int. Cong. for Electron Microscopy*. Kyoto, Maruzen Co., Tokyo, p. 43.
21. Williams, R. C. and Wyckoff, R. W. C.: (1946) *J. appl. Physiol.*, 17:23.
22. Brenner, S. and Horne, R. W.: (1959) *Biochim. biophys. Acta*, 34:103.
23. Mellerna, J. E., Van Bruggen, F. J. and Gruber, M.: (1968) *J. molec. Biol.*, 31:75.
24. Erickson, H. and Beer, M.: (1967) *Biochemistry*, 6:2694.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Barer, R.: (1951) *J. roy micr. Soc.*, p. 307.
2. Barer, R.: (1956) In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 30. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
3. Bennett, A. H. et al.: (1951) *Phase microscopy. Principles and application*. John Wiley & Sons, New York.
4. Zernike, F.: (1955) *Science*, 121:345.
5. Richards, O. W.: (1954) *Science*, 120:631.
6. Blout, E. R.: (1953) *Adv. biol. med. Phys.*, 3:286.
7. Engström, A. and Finean, J. B.: (1958) *Biological ultrastructure*. Academic Press, New York.
8. Hale, A. J.: (1958) *The interference microscope in biological research*. E. & S. Livingstone, Edinburgh.
9. Mellors, R. C., ed.: (1959) *Analytical cytology*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York.
10. Davies, H. G. and Wilkins, M. H. F.: (1952) *Nature*, 189:541.

Métodos para el análisis citológico y citoquímico

Las células y tejidos deben prepararse especialmente para el análisis con instrumentos ópticos y para el estudio de su organización química. En Biología celular se emplean muchos tipos diferentes de especímenes y técnicas.

En general, hay uno o varios tipos celulares que resultan ser los más convenientes para cada problema específico. Algunas veces, el desarrollo de una rama entera de la Citología ha dependido del descubrimiento o elección apropiada de un material determinado o de la expansión de una técnica particular. Solamente daremos algunos ejemplos al azar: el estudio del comportamiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis se realiza con mayor precisión en las glándulas sexuales de los insectos, en los meristemas de las raíces y tallos y en las células productoras del polen de los vegetales; los movimientos mitocondriales se observan en cultivo de tejidos; la permeabilidad celular se estudia en eritrocitos; la pinocitosis en amebas y la síntesis proteica en reticulocitos; la Citogenética es estudiada mejor en *Drosophila*, *Neurospora* y en cromosomas humanos, y finalmente, la Genética molecular en bacterias y virus.

EXAMEN VITAL

Existen dos procedimientos principales de análisis instrumental. Uno se efectúa directamente sobre células vivas en el organismo, o después de realizar una extracción fresca de ellas (*examen vital o supravital*). El otro método se lleva a cabo una vez matada la célula por procedimientos que preservan su morfología y composición, es decir, por *fixación*.

Los exámenes vital y supravital se aplican a células libres en un medio líquido, a células aisladas de fragmentos de tejido, a membranas transparentes, a partes transparentes de animales (por ejemplo, larvas de urodelos) y aun a órganos opacos. Este tipo de observación puede mejorarse por medio del uso de algunos colorantes que tengan poco o ningún efecto nocivo sobre las células. Como colorantes vitales o supravitales se usan, entre otros, los siguientes: rojo neutro, verde Jano, azul tripano y azul de metileno. El verde Jano es particularmente interesante porque colorea las mitocondrias de las células vivas.

Cultivo de tejidos

Uno de los métodos que permite la observación de células vivas en condiciones favorables es el *cultivo de tejidos*. Dicha técnica consiste en transferir pequeñas porciones de diversos tejidos, preferentemente embrionarios, a un medio adecuado donde las células pueden adaptarse y crecer en forma autónoma. El medio se compone generalmente de una gota de plasma y otra de jugo embrionario, que se depositan en la superficie de un cubreobjetos. Después éste se invierte sobre un portaobjetos especial, provisto de una excavación, y el conjunto se sella con parafina. En esta cámara cerrada, incubada a la temperatura del cuerpo del animal, las células poseen los elementos nutritivos y el oxígeno necesario para su desarrollo.

Las células crecen y se desplazan sobre el coágulo de plasma para formar la zona de crecimiento, que por su poco espesor se presta admirablemente a la observación celular con el microscopio de fase.^{1, 2, 3}

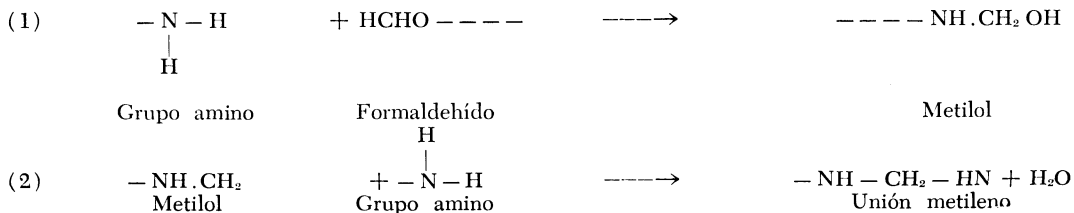
En los últimos años, con el desarrollo de los medios sintéticos, se han realizado avances significativos en el uso de las técnicas de cultivo de tejidos, con el fin de estudiar los requerimientos nutritivos de las células en crecimiento. Más aún, pequeños órganos como huesos en crecimiento y glándulas endocrinas fueron mantenidos vivos y estudiados en diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo bajo la acción de hormonas.

Uno de los adelantos más interesantes desde el punto de vista citológico ha sido el de las técnicas para el establecimiento de cepas celulares puras. Este tipo de investigación se favoreció considerablemente mediante el uso de enzimas (tripsina) y otros medios, con los cuales se pueden separar las células del tejido y cultivar grandes masas de éstas en suspensión o en cápsulas de Petri, como se ha hecho con las bacterias.^{4, 5}

Es posible también obtener colonias o clones de células provenientes de la división de una sola y entonces, por aislamiento apropiado, separar cepas celulares puras.⁶⁻⁹

Microcirugía

Éste es otro método que ha contribuido considerablemente al conocimiento de la célula viviente.^{10, 11} La microcirugía implica la introducción en las células y tejidos de micropipetas, microagujas, microelectrodos, microtermocuplas, etc., con ayuda de aparatos especiales, que permiten el movimiento controlado de esos instrumentos bajo el campo del microscopio. Con este instrumental se efectúa: 1) la disección y extracción de partes de células y tejidos; 2) la inyección



de sustancias; 3) la medida de variables eléctricas; 4) el injerto de partes de una célula en otra, y así sucesivamente.

En la figura 16-3 se expone un ejemplo de la aplicación de la microcirugía al estudio de los potenciales eléctricos de las membranas plasmáticas y nuclear.

FIJACIÓN

La fijación es esencialmente un método para la preservación de la morfología y la composición química de la célula. Consiste en la muerte de ésta, de manera que las estructuras que poseía en estado viviente se conserven con el mínimo agregado de artificios. Al mismo tiempo, algunos métodos tratan de mantener intacta su composición química.

La elección del fijador adecuado está dictada por el propósito perseguido. Por ejemplo: para el núcleo y los cromosomas se utilizan frecuentemente los fijadores ácidos, como la mezcla de Carnoy (3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial) o el líquido de Bouin (5 partes de solución saturada de ácido pícrico, 5 partes de formol al 40 por ciento [formalina] y una parte de ácido acético glacial); para el estudio de la actividad enzimática se emplean la acetona, el formaldehído o glutaraldehído, que producen una mínima desnaturalización y preservan muchos sistemas enzimáticos.^{12, 14}

La mayoría de los fijadores son soluciones que actúan esencialmente sobre la porción proteica de la célula. Al seleccionar un fijador citológico, debe buscarse el que precipite la proteína en la forma más fina y si es posible en agregados ultramicroscópicos, para que el aspecto de la célula no se modifique.

Algunos agentes fijadores como el formol, el bicromato y el bicloruro de mercurio, que se usan en las mezclas bien conocidas (Zenker, Helly, Flemming, líquido de Regaud^{15, 16}), dan lugar a fuertes uniones entre las moléculas proteicas. Por ejemplo, el formaldehído reacciona con los grupos amino, carboxilo e indol de las proteínas y produce entonces uniones de metileno con otras moléculas proteicas. Los pasos de la reacción son los siguientes:

Las sales de cromo (por ejemplo, bicromato de potasio) ocasionan oxidación y uniones de cromo entre las proteínas y se unen también a los fosfolípidos. El bicloruro de mercurio actúa sobre los grupos sulfhidrilo, carboxilo y amino de las proteínas, produciendo uniones mercúricas entre las moléculas.

Cuando se sumerge un trozo de tejido en un líquido fijador, la muerte de las células

no ocurre instantáneamente y pueden suscitarse alteraciones *post mortem* debidas a la anoxia, a cambios en la concentración de iones de hidrógenos y a la acción enzimática (autólisis). El fijador penetra en la pieza por difusión, de manera tal que la mayoría de las células periféricas se fijan más rápido y mejor que las centrales. Como consecuencia de ello, en todo tejido fijado hay siempre un *gradiente de fijación* que depende de la *penetrabilidad* del fijador y de su dilución progresiva con los líquidos celulares. La rapidez de penetración del fijador depende también de la barrera proteica de precipitación que se origina en la periferia del tejido. Así, por ejemplo, con el tetróxido de osmio la precipitación es muy fina y se produce una barrera que impide el pasaje posterior del fijador. Por este motivo, la fijación con líquidos ósmicos se hace sólo en piezas muy finas (de 0.5 a 1 mm de espesor).

Es posible observar corrientes de difusión que desplazan los componentes solubles como el glucógeno (fig. 7-1, *a*). Los fijadores también pueden extraer sustancias solubles como electrólitos, hidratos de carbono solubles y hasta algunos lípidos. Se ha demostrado que

por la fijación se extraen del 10 al 14 por ciento de las sustancias minerales de la célula.

Tetróxido de osmio

El *tetróxido de osmio* (OsO_4) es uno de los fijadores más empleados para la investigación de las estructuras celulares con el microscopio electrónico. La bien conocida reacción que tiene este fijador con los lípidos, probablemente se realiza por medio de dobles ligaduras que forman ésteres inestables de osmio, los que se descomponen para depositar óxidos o hidróxidos de osmio. Sobre las proteínas produce una gelificación inicial, dando una estructura homogénea cuando se examinan por medio del microscopio electrónico, mientras que con otros fijadores la coagulación es evidente. Esta gelificación inicial puede ser seguida de una oxidación y de la solubilización de algunos productos que entonces son susceptibles de extraerse de la célula.¹⁷

Ha sido estudiada la unión del tetróxido de osmio con los diferentes componentes químicos de la célula.¹⁸ Es interesante que los ácidos nucleicos prácticamente no se unen al OsO_4 . La fijación con osmio

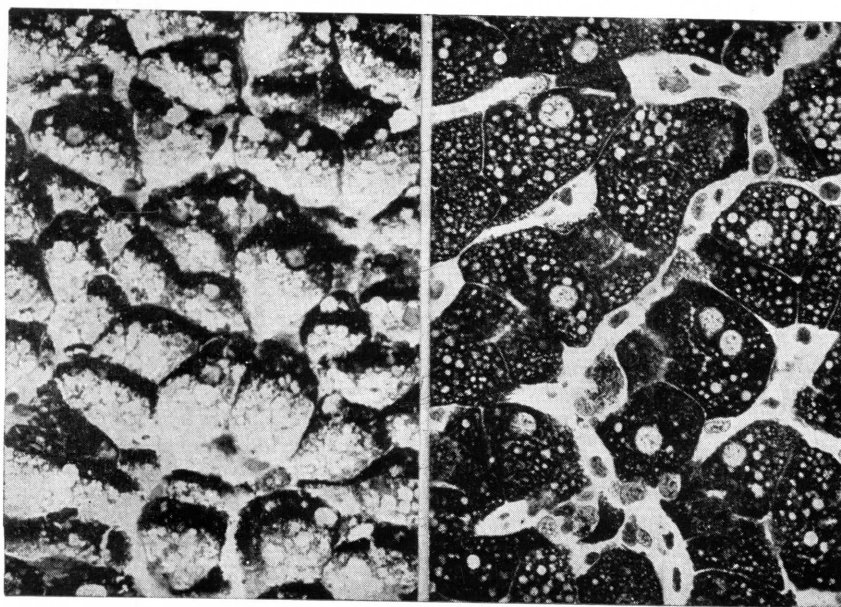


FIG. 7-1. Izquierda, *Células hepáticas de Amblystoma fijadas en Zenker-formol*. La corriente de difusión producida por el fijador químico al penetrar (desde la parte inferior de la figura a la superior) desplaza al glucógeno de las células. Coloración: carmín de Best. Derecha, *Células hepáticas de Amblystoma fijadas por congelación y desecación*. El glucógeno aparece distribuido en forma homogénea en el citoplasma. Se destacan los núcleos y las gotas de grasa de forma esférica. Coloración: carmín de Best. (Preparados del Dr. I. Gersh.)

fue mejorada por medio de: a) la introducción de soluciones *buffer* a pH fisiológico,¹⁹ b) el mantenimiento de la presión osmótica, c) la adición de iones de calcio²⁰ y d) el uso de temperaturas cercanas a 0°C.

Se han hecho extensos estudios para demostrar que esta técnica no introduce artificios. Dentro de los límites del microscopio óptico ello puede lograrse comparando la imagen de la célula viviente con la que se observa después de la fijación. Aparte de esto, el problema sólo es posible encararlo en ciertos materiales biológicos que tengan un grado de organización lo suficientemente elevado en la célula viviente como para dar birrefringencia con la luz polarizada o bien un diagrama definido de difracción con los rayos X. Un estudio correlativo de este tipo se hizo en los sistemas de lipoproteínas naturales como la vaina de mielina.^{21, 22}

El grado de organización en el nivel macromolecular es de gran importancia para la preservación de la estructura por fijación. En una estructura bien organizada, como los cromosomas, mitocondrias, cloroplastos, etcétera, existen gran número de fuerzas que interactúan manteniendo las moléculas unidas, debido a lo cual la acción del fijador es insuficiente para alterar las reacciones estructurales. Sin embargo, en regiones menos organizadas, como en el caso de la matriz citoplásmica, la preservación se vuelve más dificultosa y es más probable la producción de artificios de fijación.

Fijación por congelación-dsecación y por congelación-sustitución

El método por *congelación y desecación* consiste en : a) una rápida congelación del tejido, y b) la deshidratación en el vacío a baja temperatura. La fase inicial de congelación comienza sumergiéndose pequeñas piezas de tejido en un baño a temperatura de -160 a -190°C enfriado por nitrógeno líquido. Se empleó también la fijación en helio líquido a una temperatura cercana al 0° absoluto (Kelvin). La desecación se realiza en el vacío a -30 a -40°C. En estas condiciones, el agua de los tejidos sublima directamente al estado gaseoso y se produce la deshidratación.

Las ventajas de dicho método son obvias. No produce retracción del tejido; la fijación es homogénea en todo el espesor de la pieza; no hay extracción de sustancias solubles; la composición química se mantiene prácticamente sin cambios, y la estructura, por lo general, se conserva con las muy escasas modificaciones producidas por los cristales de hielo (fig. 7-1, b). La rapidez de la fijación permite también sorprender a las células en momentos críticos de su función, como cuando las células renales están eliminando materiales colorantes o cuando las células tiroideas

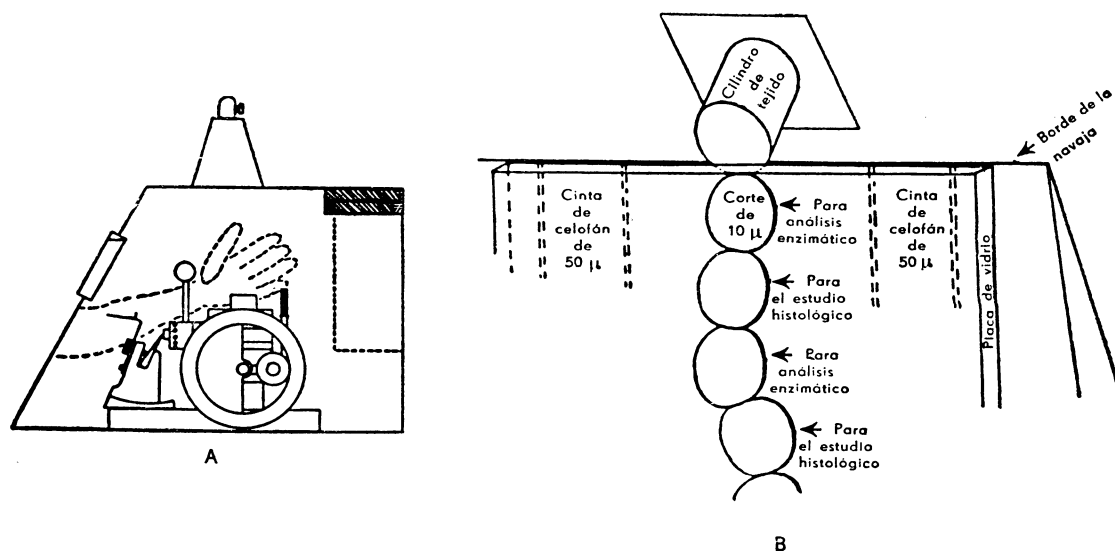


FIG. 7-2. A *Micrótopo para cortes de congelación*. El aparato hállase en una caja especialmente refrigerada que mantiene congelado el tejido y los cortes. B *Esquema de la sección de los cortes con el micrótopo de congelación*. El cilindro de tejido es seccionado y los cortes se recogen alternadamente para el análisis enzimático y el control histológico. (De Linderström-Lang.)

secretan gotas de coloide en la cavidad foliular. Algunas células pueden resistir la congelación rápida y este procedimiento se usa comúnmente para preservar espermatozoides vivos.

La técnica de congelación-dsecación debe ser considerada como intermedia entre el examen de los tejidos fijados y frescos, puesto que muchos de los componentes celulares se conservan en la misma forma soluble que en estado viviente.

En el método por *congelación y sustitución*, después de una rápida congelación, el tejido se mantiene congelado a baja temperatura (-20 a -60°C) en un reactivo que disuelve los cristales de hielo (etanol, metanol, acetona). Las ventajas son similares a las mencionadas precedentemente.

Inclusión y corte

Antes de su observación con el microscopio, los tejidos deben ser cortados convenientemente. Para este propósito se emplean con frecuencia *micrótomos de congelación*, enfriados con CO_2 líquido. Por medio de instrumentos denominados crióstatos, que están constituidos por un micrótopo encerrado en una cámara a baja temperatura, pueden realizarse cortes de tejidos fijados o frescos con fines citoquímicos (fig. 7-2).

Las técnicas de corte más usadas implican la inclusión en un material que imparte al tejido una consistencia apropiada. Para la microscopia óptica generalmente se emplea la *inclusión en parafina* o *en celoidina*. El tejido fijado se deshidrata y luego se incluye en un material, pasándolo previamente por un solvente intermediario adecuado (xileno o tolueno en el caso de la parafina, alcohol-éter para la celoidina).

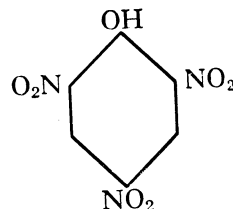
COLORACIONES CITOLÓGICAS

La mayoría de los colorantes citológicos son de naturaleza orgánica y aromática. Desde Ehrlich se reconocen dos tipos de colorantes: básicos y ácidos. En los colorantes básicos el grupo cromóforo, que imparte el color, es básico (catiónico). Por ejemplo, el azul de metileno es el clorhidrato de tetrametilitionina en el cual la parte ácida (ClH) es incolora. Algunas veces, los dos componentes de la sal son cromóforos, como en el caso del eosinato de azul de metileno. Los grupos cromóforos más usados para los colorantes ácidos con-

tenen el grupo nitrito ($-\text{NO}_2$) y el quinoide

($\text{O} = \text{C}_6\text{H}_4 = \text{O}$). Los grupos cromóforos

básicos contienen el radical azo ($-\text{N}=\text{N}-$) y el indamino ($-\text{N}=\text{N}-$). Así, en el ácido pícrico hay tres grupos nitro (cromóforos) y un grupo $-\text{OH}$, que se designa también *auxocromo* y por medio del cual el colorante se combina con el tejido.



Mecanismos de coloración

Respecto de este punto, es conveniente que el estudiante aprenda cuál es el mecanismo de acción de la mayoría de los colorantes. Para ello deberá recordar la propiedad que tienen las proteínas, ciertos polisacáridos y ácidos nucleicos de ionizarse como bases o como ácidos (véase cap. 4). Por ejemplo, una molécula proteica es anfótera y puede comportarse como un zwitterion, disociando tanto el grupo ácido como el básico.

La ionización ácida se produce por los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), sulfúrico ($-\text{HSO}_4$) o fosfórico ($-\text{H}_2\text{PO}_4$). En las proteínas la ionización básica se realiza en el grupo amino ($-\text{NH}_2$) y en otros grupos básicos. La ionización de una proteína depende de su punto isoeléctrico. Si el pH es superior a éste (véase cap. 4), los grupos ácidos se ionizan; si es menor, los grupos básicos se disocian. Debido a esta propiedad, por encima del punto isoeléctrico las proteínas reaccionan con colorantes básicos (azul de metileno, cristal violeta, fucsina básica) y por debajo de él con colorantes ácidos (naranja G, eosina, azul de anilina). La intensidad de la coloración, sea con colorantes ácidos o básicos, depende del grado de acidez o alcalinidad del medio, puesto que cuanto más grupos ácidos o básicos se disocian, mayor cantidad de colorante se unirá por uniones salinas a las proteínas (fig. 7-3). Midiendo la unión del colorante como una función del pH del medio, pueden obtenerse curvas típicas para diferentes proteínas, ácidos nucleicos y mucopolisacáridos.^{23, 24}

Para los ácidos nucleicos, la carga neta es-

tá determinada primeramente por la disociación de los grupos fosfatos y el punto isoelectrico es muy bajo (pH 2 o menos). Por esta razón, el colorear a pH bajo con colorantes básicos (por ejemplo, azul de toluidina a azul B) es selectivo para los ácidos nucleicos. El azul de toluidina se emplea frecuentemente para el ácido ribonucleico y su especificidad puede demostrarse por medio de la hidrólisis previa con ribonucleasa (fig. 7-4).

Debido a sus diferencias en los puntos isoelectricos, las afinidades tintoriales de los diversos componentes celulares suelen ser acentuadamente distintas. El citoplasma fundamental, ciertos gránulos de secreción, los eritrocitos, etcétera, se tiñen con los colorantes ácidos al pH ordinario de la coloración (pH alrededor de 6). El núcleo y las ribonucleoproteínas, mucus, mucoproteínas del citoplasma, etcétera, se colorean con los colorantes básicos.

En la actualidad se utilizan algunos métodos histológicos basados en estas propiedades tintóreas de las proteínas. Uno de los más conocidos es el del verde rápido (*fast green*) para identificar las proteínas básicas y especialmente las histonas.²⁵

Metacromasia

Algunos colorantes básicos del grupo de las tiacinas, especialmente la tionina, azul A y azul de toluidina, poseen la propiedad de te-

ñir ciertos componentes celulares con un color que difiere del original del propio colorante. Esta propiedad, denominada metacromasia, tiene interesantes derivaciones histoquímicas y fisicoquímicas.²⁶

La reacción es positiva con los mucopolisacáridos y en menor grado con los ácidos nucleicos y algunos lípidos ácidos. Es asimismo más intensa en aquellas células que poseen grupos sulfatos, como en el caso del condroitinsulfato (cartílago, tejido conectivo).

En células mucosecretantes, leucocitos basófilos y mastocitos, tales inclusiones en vez de ser teñidas con el color ordinario del colorante adquieren un tinte rojovioláceo (acción metacromática). También hay otras sustancias intercelulares que toman el mismo color como la matriz del cartílago, tendones, córnea y la sustancia gelatinosa del cordón umbilical.

Según algunos autores, la metacromasia depende de la formación de agregados moleculares, dímeros y polímeros, del colorante sobre dichos compuestos.²⁷ Los mismos colorantes básicos, cuando actúan sobre los ácidos nucleicos, no forman polímeros. En este caso, cada catión del colorante se combina con uno de los grupos ácidos de la cadena fosfórica del ácido nucleico, constituyéndose un compuesto semejante a una sal. Para que se realice la reacción metacromática es necesario al pare-

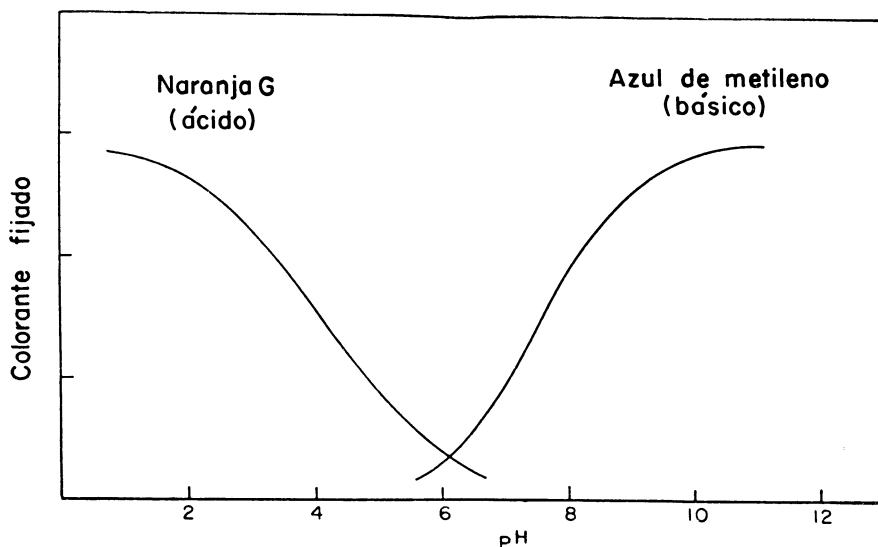


FIG. 7-3. Curvas que indican la cantidad de colorante fijado por una proteína en relación al pH. Se observa que tanto el colorante ácido como el básico tienen un mínimo de fijación en el punto isoelectrico de la proteína. (De Singer y Morrison²³.)

cer que exista una distancia de 5 Å entre los grupos aniónicos.²⁸

HISTOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA

El propósito inmediato de la *Citoquímica* consiste en la identificación y localización de los diferentes compuestos químicos dentro de

la célula. Como puntualizara R. R. Bensley, uno de los fundadores de la moderna Citología: "La finalidad de la Citoquímica es la de descubrir, dentro de los exigüos confines de la célula, esa organización química tan misteriosa y fugaz que es la base de la vida."

Este propósito es tanto cuantitativo como cualitativo, y una vez que se lleva a cabo, el

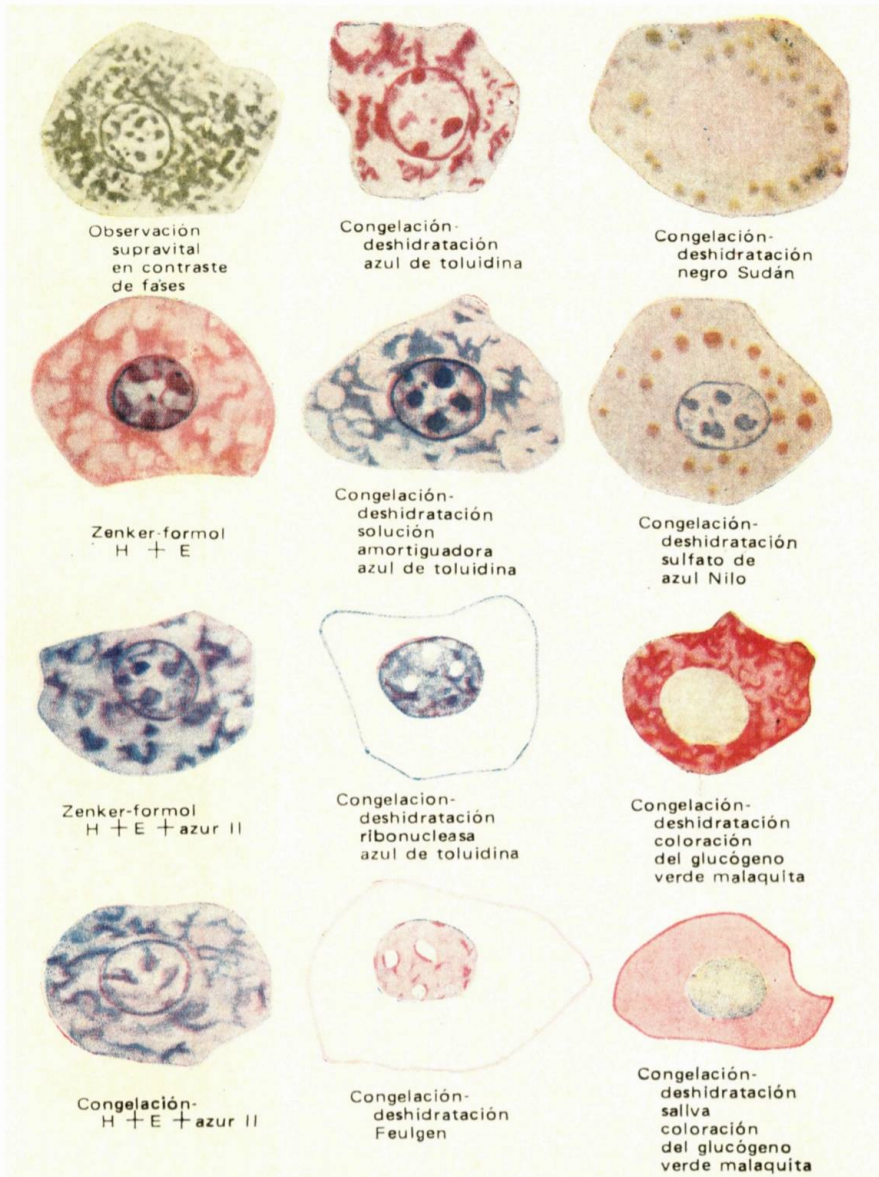


FIG. 7-4. Células de hígado de ratón fijadas y coloreadas por una variedad de procedimientos citoquímicos que evidencian la distribución del ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, glucógeno y gotas de lípidos. Como estos métodos fueron aplicados a materiales fijados por congelación y desecación, algunos de los cortes se compararon con otros fijados en Zenker-formol. Para una mejor orientación, se agregó también una célula coloreada con hematoxilina y eosina y una célula, no fijada, fotografiada en contraste de fase. (Cortesía de W. Bloom.)

paso siguiente implica el estudio de los cambios dinámicos en la organización citoquímica durante los distintos estadios funcionales. En tal sentido es posible establecer el papel que desempeñan los diferentes componentes celulares en los procesos metabólicos de la célula.

La Citoquímica está incluida dentro de un campo más general, la *Histoquímica*, que trata de la caracterización química y localización de sustancias o grupos de sustancias en las células y los espacios intercelulares de un tejido.

Los principales resultados de la aplicación de los métodos citoquímicos se encontrarán dispersos a lo largo de los distintos capítulos. Aquí se harán solamente ciertas considera-

ciones generales y metodológicas y se mencionarán algunos de los materiales no incluidos en otras partes.

Las consideraciones acerca del empleo de las numerosas técnicas citoquímicas exceden en mucho los límites de este libro (véase 29-33).

La Citoquímica moderna ha seguido tres principales métodos de investigación. De ellos sólo uno puede considerarse estrictamente microscópico, porque comprende una serie de procedimientos químicos y físicos empleados para individualizar o medir diferentes componentes químicos en el interior de la célula.

Los otros dos métodos están más relacionados con la Bioquímica y Microquímica,

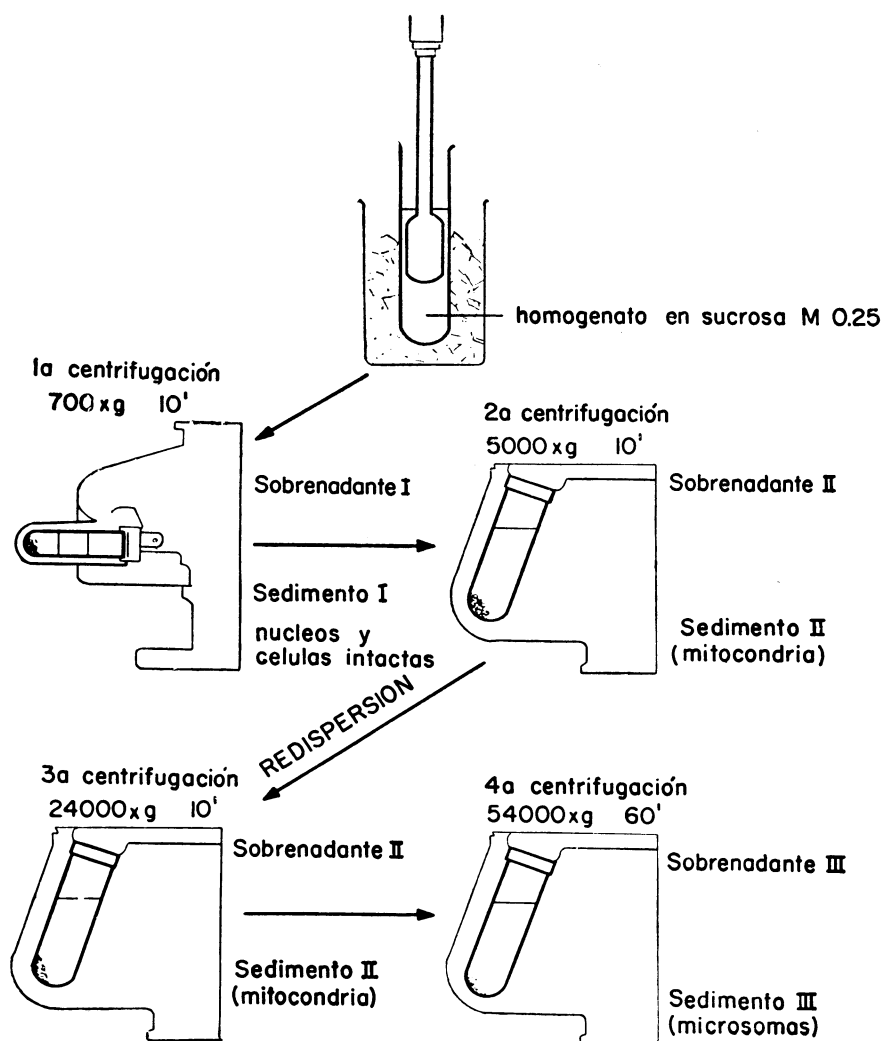


FIG. 7-5. Esquema de un fraccionamiento celular.

puesto que implican el desarrollo de técnicas para la determinación de pequeñas cantidades de material. Ya indicamos en el capítulo 1 y en la tabla 1-2 las relaciones existentes entre las dimensiones lineales, los pesos y los campos de análisis químico. En dicha tabla puede observarse que las sustancias en las células se encuentran en picogramos 10^{-12} g). De los métodos citados, uno emplea la técnica bioquímica convencional sobre fracciones subcelulares, que son aisladas y estudiadas. El otro —el de la *microquímica* y *ultramicroquímica*— se aplica a mínimas cantidades de material que pueden comprender a unas pocas células aisladas, o incluso, a partes de células.

Métodos de fraccionamiento celular

Estos métodos consisten esencialmente en la homogeneización o destrucción de los límites celulares, por medio de diferentes procedimientos mecánicos o químicos, separando luego las fracciones subcelulares de acuerdo con su masa, superficie y peso específico. Finalmente, las diferentes fracciones celulares se analizan por métodos bioquímicos o microquímicos. La aplicación de estas técnicas es importante para el estudio de la constitución química de los diferentes componentes celulares. Con ellas se aislaron y estudiaron los núcleos (fig. 17-2), nucléolos (fig. 17-2), cromosomas, mitocondrias (fig. 11-8), complejo de Golgi (fig. 10-16), microsomas, aparato

mitótico (fig. 13-9), ásteres, ribosomas, terminaciones nerviosas (fig. 24-17), vesículas sinápticas (fig. 24-19), gránulos de secreción, lisosomas (fig. 21-12) y otros componentes celulares. Estos resultados son de gran interés, cuando se basan en una caracterización citológica precisa de la fracción celular. En ese sentido nada es mejor ni más exacto que el análisis de las fracciones aisladas por medio del microscopio electrónico.

Diversos métodos de fraccionamiento celular se utilizan actualmente. La mayoría de ellos están basados en la homogeneización o desintegración mecánica de la célula en un medio acuoso, generalmente sacarosa, a distintas concentraciones (fig. 7-5). También pueden utilizarse medios no polares como en el método de Behrens para la separación de los núcleos, que tiene la ventaja de reducir la pérdida de sustancias solubles, por ejemplo, proteínas y ciertas enzimas.

En la figura 7-5 se ha esquematizado un procedimiento corriente. El hígado de un animal se perfunde primero con una solución salina helada y luego con sacarosa 0.25 M también fría. Se hace atravesar el tejido por un disco de acero perforado y por último se lo homogeneiza en la solución de sacarosa 0.25 M.

Este tipo clásico de fraccionamiento celular se efectúa para subdividir los componentes celulares en cuatro fracciones morfológicamente diferentes: nuclear, mitocondrial, micro-

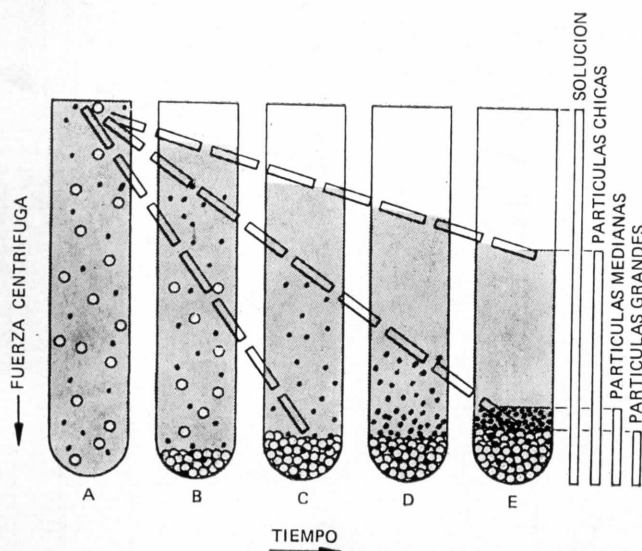


FIG. 7-6. Esquema que evidencia el efecto de un campo centrífugo sobre partículas de distinto tamaño. (Véase la descripción en el texto.) (De N. G. Anderson.)

sómica y soluble. En algunos tejidos glandulares se obtiene una quinta fracción que contiene gránulos de secreción.

Es importante a esta altura hacer referencia a la pureza de las fracciones obtenidas, así como también al problema de la nomenclatura. Debe diferenciarse con claridad entre *fracciones* y las partes de la célula que se encuentran en ellas. En la fracción mitocondrial del hígado, no cabe duda que este orgánulo constituye el principal componente, pero la "fracción mitocondrial" del cerebro es muy heterogénea y contiene, además de mitocondrias libres, terminaciones nerviosas y mielina.³⁴ Los microsomas no existen como tales en las células y dicha fracción comprende principalmente partes fragmentadas de retículo endoplásmico incluyendo los ribosomas, el complejo de Golgi y otras membranas.

Centrifugación diferencial. En los ejemplos antes mencionados, el método que se utiliza para la separación de las partículas subcelulares recibe el nombre de *centrifugación diferencial*. Según la fuerza de gravitación requerida, son utilizados para tal fin centrifugas *ordinarias* o *preparativas*. El efecto del campo centrífugo sobre partículas de diferentes tamaños se indica en la figura 7-6. Al principio, todas las partículas están distribuidas homogéneamente (A), pero a medida que tiene lugar la centrifugación $B \rightarrow E$, se depositan de acuerdo con sus respectivas velocidades de sedimentación. Esta se completa para las partículas más grandes en C, mientras que en E también sedimentan las medianas (la distribución final de las partículas, al concluir la centrifugación E, se halla indicada por las barras a la derecha; se observa la existencia de contaminación cruzada entre partículas de diferente tamaño). En este método, el tiempo requerido por cada partícula para alcanzar el fondo del tubo depende de su tamaño y densidad.

Un principio similar al anterior puede utilizarse para separar partículas aún más pequeñas, como virus o macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, etcétera), en la *ultracentrifuga analítica*. En ella, por medio de ventanas transparentes en el tubo y técnicas ópticas y electrónicas se observa el desplazamiento de las partículas y se determinan sus respectivos *coeficientes de sedimentación*. Dicho coeficiente, expresable en unidades S, está en relación con el peso molecular de la partícula. Así, el ácido ribonucleico (ARN) de transferencia 4 S tiene un peso molecular de 25,000 Daltons.

Centrifugación en gradientes. Las técnicas de ultracentrifugación diferencial son susceptibles de ser perfeccionadas con la introducción de gradientes de densidad, sean éstos *discontinuos* o *continuos*. En el primer caso, el tubo de la centrifuga se llena con sucesivos volúmenes de soluciones de diferente densidad (por ejemplo, soluciones de sacarosa cuya molaridad varíe desde 1.6 a 0.5 a partir del fondo del tubo); en el segundo se obtiene un gradiente continuo mediante la mezcla de dos soluciones de sacarosa de diferentes concentraciones a distinta velocidad. Una vez que se ha formado cualquiera de los dos gradientes, la muestra es colocada sobre éste y se centrifuga hasta que las distintas partículas alcanzan su posición de equilibrio con respecto al gradiente. Por esa causa, este tipo de separación se denomina también *centrifugación isopícnica*.^{35, 36}

Variantes más elaboradas de este método inclu-

yen el uso de agua pesada, cloruro de cesio o medios con diferentes coeficientes de partición.³⁷

Para evitar cambios drásticos en la presión osmótica se utilizan macromoléculas como glucógeno o Ficoll. El gradiente se basa fundamentalmente en diferencias de viscosidad del medio.

Centrifugación zonal. Las técnicas de ultracentrifugación han recibido nuevo impulso con el advenimiento de los denominados *rotos* *zonales*. Como se aprecia en la figura 7-7, el gradiente se forma mientras el rotor está girando; se introduce entonces la muestra y se centrifuga hasta que las partículas alcanzan su zona de sedimentación isopícnica correspondiente. En ese momento, mediante la introducción de una solución de sacarosa de densidad mayor que la del gradiente, las distintas zonas o bandas formadas son extraídas del rotor y recolectadas en sucesivos tubos de un colector de fracciones. (Para profundizar este tema véase Anderson, 1966.)

Densidad de flotación. La centrifugación isopícnica en rotos preparativos o zonales permite la determinación de la densidad de flotación de una macromolécula, es decir, la densidad en la cual ésta se encuentra en equilibrio con el medio. Ello adquiere importancia en Biología molecular, particularmente en el estudio de los ácidos nucleicos. Se darán más adelante varios ejemplos de ácido desoxirribonucleico (ADN) con diferentes densidades de flotación, lo cual se halla relacionado con el contenido de bases GC (véanse caps. 17 a 19).

Microquímica y ultramicroquímica

Se han inventado en los últimos años muchos métodos ingeniosos para el análisis cuantitativo de pequeñas cantidades de sustancia. Los detalles de estas técnicas se proporcionan en las monografías especializadas. ^{32, 38, 41}

El empleo de dichos micrométodos es particularmente ilustrativo cuando se combinan los análisis químicos o las determinaciones enzimáticas con los métodos citológicos. En este caso puede obtenerse una correlación entre la función celular y la topografía química. Por ejemplo, cortando tejidos recientemente congelados en un *crióstato* (fig. 7-2), algunos cortes se pueden pesar en una balanza hecha con una fina fibra de cuarzo y luego llevarse a cabo determinaciones enzimáticas, empleando ultramicropipetas y buretas, y métodos microcolorimétricos y microespectrofotométricos. Son de mayor sensibilidad aún los métodos microfluorométricos, aplicables a la determinación de diferentes enzimas y coenzimas.

Presentan considerable interés asimismo los métodos *micromanométricos*. Uno de ellos emplea el microrrespirómetro, denominado buzo cartesiano, que tiene una sensibilidad 1000 veces mayor que el clásico método de Warburg. Con aquél se puede determinar el consumo de oxígeno de un solo huevo de erizo de mar a intervalos cortos. La balanza del buzo cartesiano de Zeuthen⁴² está basada en principios similares y permite pesar una sola ameba con gran precisión. Con este método tan sensible fue posible seguir los cambios en el peso de la ameba durante su ciclo vital, en inanición, así como también estudiar las correlaciones con el metabolismo de la célula.⁴³

Por medio de métodos *microcromatográficos* y *microelectroforéticos* se determinó el contenido en áci-

do ribonucleico de una sola célula nerviosa.^{44, 45} Se disecaron células con un micromanipulador y luego se extrajo el ácido ribonucleico y se lo hidrolizó. A continuación se absorbió el extracto sobre una fibra celulósica y los mononucleótidos fueron separados por electroforesis. Finalmente, se realizó la determinación de los nucleótidos con el método de absorción espectrofotométrica a la luz ultravioleta.

Métodos de coloración citoquímicos e histoquímicos

El tercer método comprende todas las técnicas físicas y químicas mediante las cuales se puede obtener, con el microscopio, una visualización directa de las distintas sustancias de la célula. Para cualquier determinación citoquímica de una sustancia deben cumplirse varias condiciones:

1) La sustancia ha de ser inmovilizada en su localización original. Esto es relativamente fácil con los componentes no difusibles como las proteínas, nucleoproteínas o lípidos, pero difícil de alcanzar con las sustancias difusibles: hidratos de carbono, iones, etc. Hemos mencionado anteriormente la importancia de los métodos de congelación-dsecación y de congelación-sustitución para este propósito.

2) La sustancia debe ser identificada por un procedimiento que sea específico para ella o para el grupo químico al cual pertenece.

Esta identificación se verifica: a) mediante reacciones químicas similares a las usadas en química analítica pero adaptadas a los tejidos;

b) por medio de reacciones que sean específicas para ciertos grupos de sustancias, y c) por métodos físicos.

Para demostrar proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos en la estructura celular pueden usarse algunos agentes cromogénicos que se unan selectivamente a ciertos grupos específicos de estas sustancias. Las mejores reacciones implican por lo general la formación de uniones covalentes. En cada caso se puede aumentar la especificidad utilizando métodos colaterales que comprendan la extracción, bloqueo o digestión enzimática de los componentes no específicos. Aquí se mencionarán sólo unas pocas coloraciones citoquímicas que se usan ampliamente en Citología.

Citoquímica de proteínas

Los métodos más empleados para la investigación de proteínas en tejidos son los siguientes:

1) La *reacción de Millon*, en la que el reactivo nitroso-mercúrico se aplica a tejidos y reacciona con los grupos de tirosina presentes en las cadenas laterales de las proteínas, dando un precipitado de color rojo.

2) La *reacción del diazonio*, en la cual el agente cromogénico es un hidróxido de diazonio, que reacciona con los grupos de tirosina, triptófano o histidina, formando un complejo coloreado.⁴⁶

3) Los *métodos para los grupos -SH*, que implican el uso de reactivos que pueden unirse al grupo -SH por una unión mercaptida de tipo covalente.

Primero se usó con este propósito un reactivo rojo

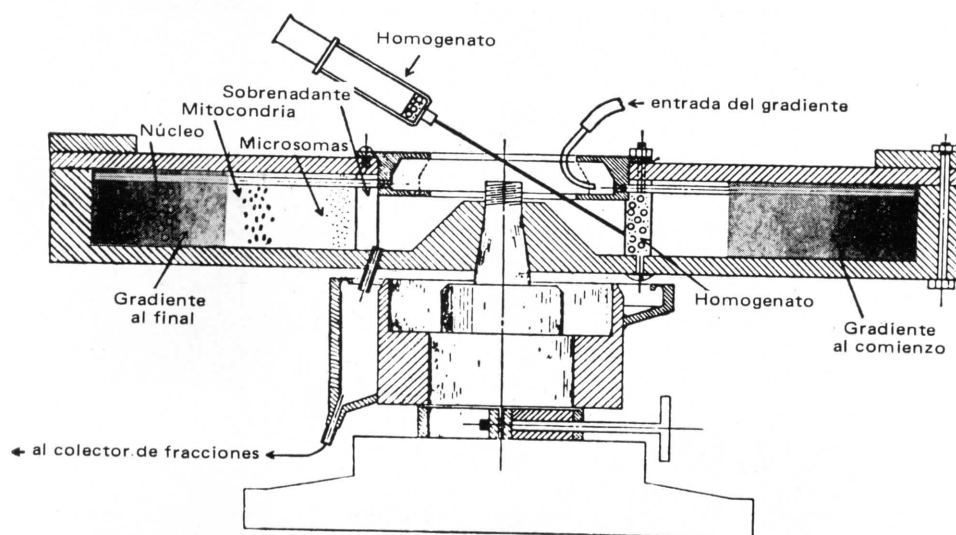


FIG. 7-7. Esquema de un corte a través de un rotor zonal. Se indica la entrada del gradiente y de la muestra, así como la salida de las capas, después de la centrifugación. (Véase descripción en el texto.) (De N. G. Anderson.)

para sulfhidrilos, el 1-(4-cloromercurifenilazo)-naftol 2,47 El contenido en grupos —SH de las células de los tejidos coloreados con esta técnica, puede medirse cuantitativamente por medio del análisis fotométrico.⁴⁸ Un ejemplo de la aplicación de este método es el importante problema de los grupos —SH en la mitosis,⁴⁹ como se observa en la figura 13-11. Además se emplean ampliamente otros métodos para determinar grupos —SH.^{50, 52}

4) Los *métodos para la arginina*, que incluyen el test de Sakaguchi. La alta concentración de arginina en un tejido es índice de proteínas básicas, como las histonas.

Métodos basados en la demostración de aldehídos

El ácido desoxirribonucleico, ciertos hidratos de carbono y los lípidos pueden demostrarse por medio de un solo reactivo para grupos aldehídos, el de Schiff. Para prepararlo se trata fucsina básica, que contiene pararosanilina, con anhídrido sulfuroso, transformándose en un compuesto incoloro (ácido bis-N aminosulfónico o reactivo de Schiff) que luego es "recolorado" por los grupos aldehídos presentes en el tejido. En los tests histoquímicos en que se usa reactivo de Schiff, pueden considerarse dos tipos de aldehídos: a) *aldehídos libres*, presentes en forma natural en los tejidos, como aquellos que dan la reacción plasmal, y b) *aldehídos* producidos por oxidación selectiva (reacción del PAS) o por hidrólisis selectiva (reacción de Feulgen o nuclear).

Técnicas citoquímicas para los ácidos nucleicos

Los métodos citoquímicos para los ácidos nucleicos dependen de las propiedades de los tres componentes que constituyen el nucleótido (ácido fosfórico, carbohidrato, bases púricas o pirimídicas; véase cap. 4). También depende del grado de polimerización de la cadena de polinucleótidos.

La presencia de bases nitrogenadas, tanto en el ADN como en el ARN, da lugar a la absorción de la luz ultravioleta a 2600 Å. La desoxirribosa presente en el ADN es responsable de la reacción de Feulgen, específica para este tipo de ácidos nucleicos (tabla 7-1).

El ácido fosfórico origina la basofilia del ADN y también del ARN. Entre las coloraciones básicas, el azur B produce una reacción que puede aplicarse a ambos.^{53, 54} Otra coloración para el ADN, basada en el uso del verde metilo, depende también de los residuos fosfóricos.⁵⁵

Reacción nuclear de Feulgen. El ADN puede ser estudiado por medio de la *reacción nuclear*, una técnica desarrollada en 1924 por Feulgen y Rossenbek. En este método, los cortes de tejido fijado se someten a una hidrólisis ácida débil y luego se tratan con el reactivo de Schiff para aldehídos. Esa hidrólisis es suficiente para extraer el ARN, que desaparece, pero no el ADN. El mecanismo de esta reacción tiene los siguientes pasos: 1)

TABLA 7-1. Algunas reacciones específicas empleadas en el análisis citofotométrico (Según Moses⁵⁸)

Sustancia	Test o reacción	Máxima absorción (Longitud de onda en Å)
Nucleótidos totales	Absorción natural de purinas y pirimidinas	2600
Nucleótidos solubles	Absorción natural de purinas y pirimidinas	2600
Ácido ribonucleico (ARN)	Absorción natural de purinas y pirimidinas	2600
Ácido desoxirribonucleico (ADN)	Absorción natural de purinas y pirimidinas	2600
Ácido desoxirribonucleico	Reacción nuclear de Feulgen para la desoxirribosa	5500-5750
Ácido desoxirribonucleico (grupos del ácido fosfórico)	Verde de metilo	6450
Ácidos nucleicos (grupos del ácido fosfórico)	Azur A	5900-6250
Proteínas (grupos básicos libres)	Verde rápido (<i>fast green</i>)	6300
Proteína (tirosina)	Reacción de Millon	3550
Polisacáridos con grupos 1-2 glicólicos	Reacción de PAS (Periodic acid-Schiff)	~5500

la hidrólisis ácida extrae las purinas a nivel de la unión desoxirribosa-purina del ADN y de esta manera libera los grupos aldehídos de la desoxirribosa; 2) los grupos aldehídos libres reaccionan con el reactivo de Schiff (fig. 7-8).^{56, 57}

La hidrólisis ácida debe hacerse en condiciones bien controladas, puesto que si se lleva muy lejos puede producir la hidrólisis total del ADN.⁵⁶

La especificidad de la reacción se confirma tratando los cortes con desoxirribonucleasa, enzima que extrae el ADN.^{57, 58, 59}

Cuando se aplica a la célula, la reacción es positiva en el núcleo y negativa en el citoplasma (fig. 7-4). En el núcleo, los cromonemas y en especial los cromocentros son particularmente positivos; el nucléolo es Feulgen-negativo (fig. 7-9).

Reacción de PAS o periodic acid-Schiff

McManus⁶⁰ ideó una reacción basada en la oxidación de los grupos "glicólicos 1-2" de los polisacáridos, por medio del ácido peryódico, produciéndose la liberación de grupos aldehídos, que dan positiva la reacción de Schiff (fig. 7-10). Este test es positivo en células vegetales para el almidón, celulosa, he-

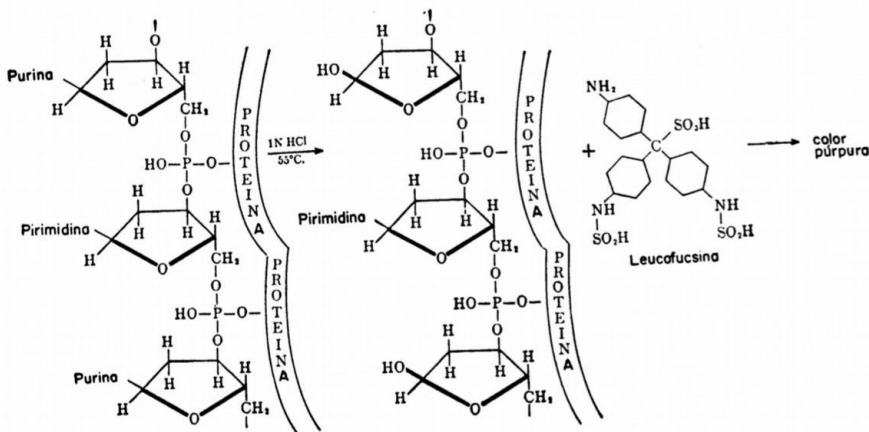


FIG. 7-8. Química de la reacción nuclear de Feulgen. La hidrólisis ácida extrae las purinas y deja en libertad los grupos aldehídos que reaccionan con la leucofucsina (reactivo de Schiff) para dar el color púrpura. En el esquema, el tamaño de la desoxipentosa está muy exagerado en relación con el de la proteína. (De Lessler, 1953.)

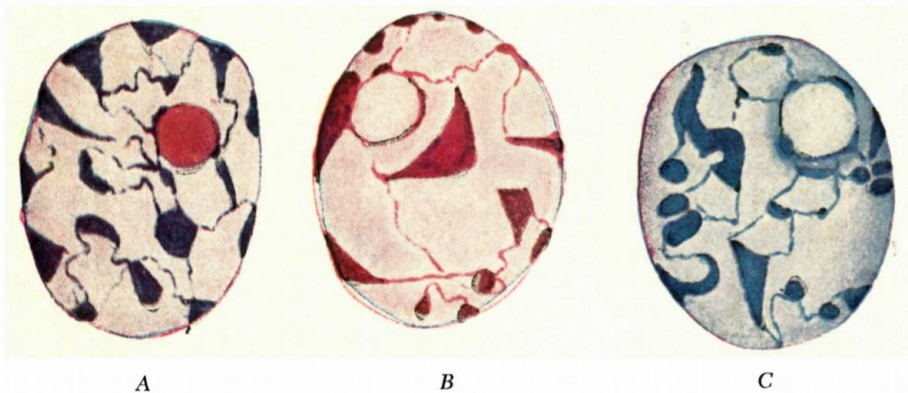


FIG. 7-9. Núcleos interfásicos de células pancreáticas. Fijación por congelación y desecación. A Coloración con Azán: se destacan el núcleo en rojo, los filamentos cromonémicos con partes engrosadas (cromocentros) y el jugo nuclear. B Reacción de Feulgen: el nucléolo da una reacción negativa, en el jugo nuclear la reacción es ligeramente positiva. C Acción de la ribonucleasa y coloración con Azán: el nucléolo no se tiñe debido a la digestión del ácido ribonucleico. (De Robertis, Montes de Oca y Raffaele.)

micelulosa y pectinas, y en células animales, para mucinas, mucoproteínas y probablemente también para el ácido hialurónico y la quitina.

Otra reacción se basa en principios similares, pero empleando tungstato de sodio en un medio ácido como oxidante, seguido de irradiación con luz ultravioleta. Todos los componentes que poseen grupos glicólicos aparecen de color azul después de haberse realizado la reacción.⁶¹

Puesto que muchas sustancias dan positiva la reacción de PAS, se pueden aplicar diferentes tests para mejorar su especificidad. Por ejemplo, empleando enzimas como la ptialina o la amilasa es posible extraer el glucógeno (fig. 7-4), y con la hialuronidasa, separar el ácido hialurónico. Con el mismo propósito se utilizan también algunos procedimientos de extracción o bloqueo.

Técnicas histoquímicas para lípidos. Reacción plasmal

Las gotas de grasa se demuestran por medio del tetróxido de osmio que las colorea de negro, reaccionando principalmente con los ácidos grasos no saturados. Las coloraciones con Sudán III o rojo escarlata tienen mayor valor histoquímico. Estos colorantes actúan por un simple proceso de difusión y solubilidad, acumulándose en el interior de las gotas de líquido. El Sudan black B (fig. 7-4) presenta la ventaja de disolverse también en los fosfolípidos y el colesterol, y de producir un contraste mayor.⁶² El sulfato de azul de Nilo se usa para reconocer los lípidos ácidos, entre los que se incluyen los ácidos grasos, y los fosfolípidos. Un test para fosfolípidos emplea el tratamiento con sales de cromo seguido de hemateína ácida.⁶³

Algunos aldehídos alifáticos de cadena larga dan la llamada *reacción plasmal*, que consiste en el tratamiento directo del tejido con el reactivo de Schiff. Como las sustancias que producen dicha reacción son solubles en solventes orgánicos, el tejido no debe ser incluido y generalmente se lo estudia en cortes por

congelación. Estos compuestos pueden ser aldehídos libres como el *palmital*, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CHO}$, y el *estearal*, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CHO}$, correspondientes a los ácidos palmítico y esteárico, constituyendo ambos el denominado *plasmal*.⁶⁴

Citoquímica de enzimas

La identificación y localización de enzimas constituye uno de los campos de más rápido desarrollo dentro de la Citoquímica. Hasta hace pocos años, prácticamente las únicas enzimas que podían investigarse eran las del tipo oxidativo. En 1939 se abrió un nuevo capítulo en la Citoquímica enzimática, con la demostración de la fosfatasa alcalina en los cortes de tejidos, permitiendo la localización citológica de gran número de otras enzimas hidrolíticas.⁶⁵

Debido a la acción inactivante de la mayoría de los fijadores, la preparación de los tejidos es muy significativa para conservar la actividad enzimática. Para algunas enzimas los cortes deben realizarse sin fijar, por congelación en el crióstato; en otros casos la enzima resiste una breve fijación en acetona fría, formaldehído, glutaraldehído y otros dialdehídos.¹²

Las técnicas enzimáticas se basan en la incubación de los cortes de tejido con un sustrato apropiado. Por ejemplo, en el método de Gomori para la fosfatasa alcalina se emplean como sustrato ésteres fosfóricos de glicerol. El ión fosfato liberado por hidrólisis se convierte en una sal metálica insoluble generalmente en presencia de Ca^{++} y ésta a su vez se visualiza por su conversión en plata metálica, sulfuro de plomo, sulfuro de cobalto y otros compuestos coloreados.

Otra técnica, usada primero para la fosfatasa alcalina libre,^{66, 67} consiste en el uso, como sustrato, de un éster fosfórico de beta-naftol. La hidrólisis libera beta-naftol, el cual, en presencia de una sal de diazonio, se combina inmediatamente dando un componente coloreado en el sitio de la actividad enzimática (fig. 7-11). Cambiando el sustrato y

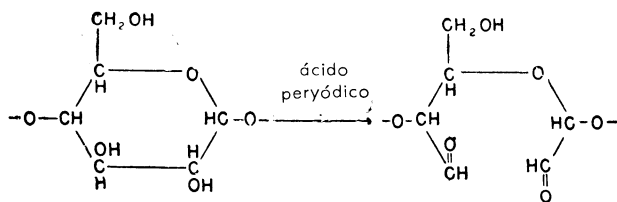


FIG. 7-10. Esquema químico de un polisacárido en el que se observa el sitio de acción del ácido peryódico en la reacción PAS de McManus. Los aldehídos resultantes reaccionan con el líquido de Schiff.

otras condiciones, el método es aplicable a diversas enzimas hidrolíticas como la estearasa, lipasa, fosfatasa ácida, sulfatasa, beta-glucuronidasa, etcétera.

TABLA 7-2. Algunas fosfatasa estudiadas citoquímicamente

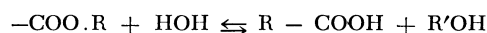
<i>Tipo</i>	<i>Sustrato</i>
<i>Fosfomonoesterasas:</i>	
I Fosfatasa alcalina	α o β-glicerosfosfato naftilfosfato
II Fosfatasa ácida	
Adenosintrifosfatasa (ATPasa)	Adenosintrifosfato
5-Nucleotidasa	Ácido 5-adenílico
Fosfamidasu	Fosfocreatina
	Diaminas del ácido naftilfosfórico
Glucosa 6-fosfatasa	Glucosa 6-fosfato
Tiamina-pirofosfatasa	Tiamina-pirofosfato
Pirofosfatasa	Pirofosfato de sodio
	Dinaftilpirofosfatos
<i>Fosfodiesterasas:</i>	
I Ribonucleasa	Ácido ribonucleico
II Desoxirribonucleasa	Ácido desoxirribonucleico

Fosfatasa. Son enzimas que liberan ácidos fosfóricos de distintos sustratos. Se diferencian entre sí respecto de la especificidad del sustrato, el pH y la acción de inhibidores e inactivadores. Las más conocidas son las *fosfomonoesterasas*, que hidrolizan

ésteres simples que resultan de la unión P-O, y las *fosfamidasas*, que hidrolizan las uniones P-N.

En la tabla 7-2 se citan las fosfatasa más comunes estudiadas histoquímicamente con algunos de los sustratos empleados. Se da un ejemplo de la reacción para la fosfatasa alcalina en la figura 7-12.

Esterasas. Catalizan la siguiente reacción reversible:



Se las ha dividido en: a) *esterasas simples* o *aliesterasas*, que hidrolizan ésteres de cadenas alifáticas cortas; b) *lipasas*, que atacan ésteres con cadenas de carbono largas, y c) *colinesterasas*, que actúan sobre ésteres de colina.³³

Existen tres métodos principales para las esterasas simples y las lipasas. En ellos se emplean como sustrato: a) ésteres de ácidos grasos solubles en agua (tween),⁶⁵ b) azocolorantes como el β-naftil acetato⁶⁸ y c) indoxil acetato.⁶⁹ Las colinesterasas se subdividen generalmente en: “verdaderas” o “específicas”, que hidrolizan acetilcolina, y “seudo” o “no específicas”, que actúan sobre otros ésteres de colina. Se han realizado importantes avances desde la introducción de la acetiltocolina como sustrato histoquímico para la colinesterasa.⁷⁰

Otras enzimas hidrolíticas, estudiadas histoquímicamente, son: la β-D-glucuronidasa, α- y β-D-galactosidasas, arilsulfatasa y aminopeptidasa.

En la figura 7-13, B, se da un ejemplo de la reacción de aminopeptidasa, enzima proteolítica capaz de atacar uniones peptídicas adyacentes a grupos α-amino terminales (fig. 5-1).

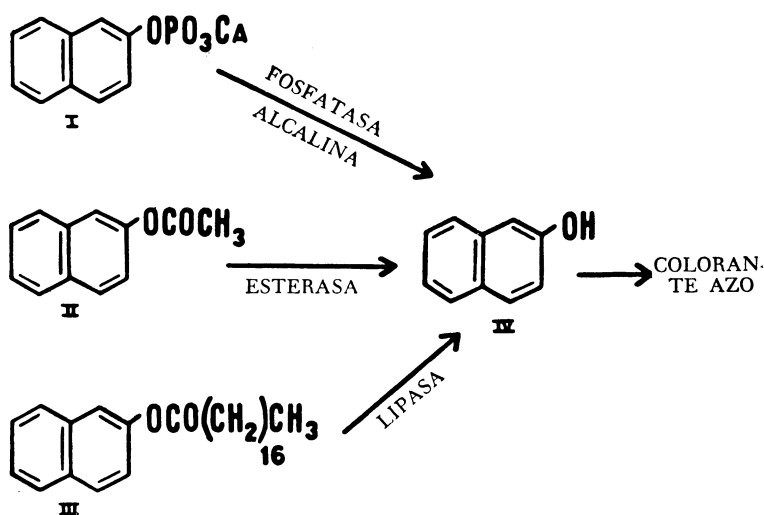


FIG. 7-11. Esquema que indica las etapas citoquímicas en los métodos para la demostración de enzimas hidrolíticas. (Véase la descripción en el texto.) (Seligman y col.⁶⁸.)

Oxidasa. Son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de un sustrato dador al oxígeno (véase capítulo 5). Generalmente contienen hierro (catalasa y peroxidasa), o bien poseen cobre (tirosinasa y polifenoloxidasa). La monoaminoxidasa es otra enzima de esta serie, que está implicada en el metabolismo del indol y de las catecolaminas. Para las peroxidasa se utilizan sustancias incoloras como la bencidina. Éstas, bajo la acción del H_2O_2 y en presencia de la enzima, se transforman en sustancias coloreadas. La *citocromooxidasa* da la llamada *reacción de Nadi*, ya que oxida la mezcla de naftol y dimetilparafenilendiamina (reactivo Nadi; figura 7-14). La bien conocida coloración vital con verde Jano también está relacionada con la actividad de oxidasa de las mitocondrias. El colorante se reduce y se vuelve incoloro tan pronto como penetra en la célula, pero es reoxidado específicamente por las mitocondrias (véase cap. 11).

Recientemente, el reactivo 3',3'-diaminobencidina (DAB) ha sido empleado para el estudio de la peroxidasa⁷¹ y de la citocromo-

oxidasa con el microscopio electrónico.⁷² Se postula que el DAB oxidado reacciona con el tetróxido de osmio (fig. 11-10).

Deshidrogenasas. La mayoría de las reacciones oxidativas catalizadas enzimáticamente son deshidrogenaciones, es decir, procesos de transferencia de electrones del sustrato (dador de protón) al agente oxidante o aceptor de electrones. Este proceso se explicó en el capítulo 5.

De hecho, las deshidrogenasas representan los primeros componentes de la cadena de enzimas que, en etapas sucesivas, son capaces de transferir hidrógeno del sustrato al oxígeno molecular. Por ejemplo, la succínico-deshidrogenasa y las *piridinnucleótido-deshidrogenasas*, que pueden ir a través del DPN o TPN (difosfo o trifosfopiridinnucleótido). Otros grupos de deshidrogenaciones se catalizan por medio del sistema de los nucleótidos de flavina.

Entre las enzimas más conocidas que usan DPN se encuentran la láctico-deshidrogenasa, que transforma el lactato en piruvato; la málico-deshidrogenasa (malato $\rightarrow$ oxalacetato), etcétera. Entre las enzimas que usan TPN se hallan la isocítrico-deshidrogenasa y la enzima málica (malato $\rightarrow$ piruvato, CO_2).³³

Desde el punto de vista histoquímico se han utilizado el telurito, el triazol y el tetrazolium, pero de

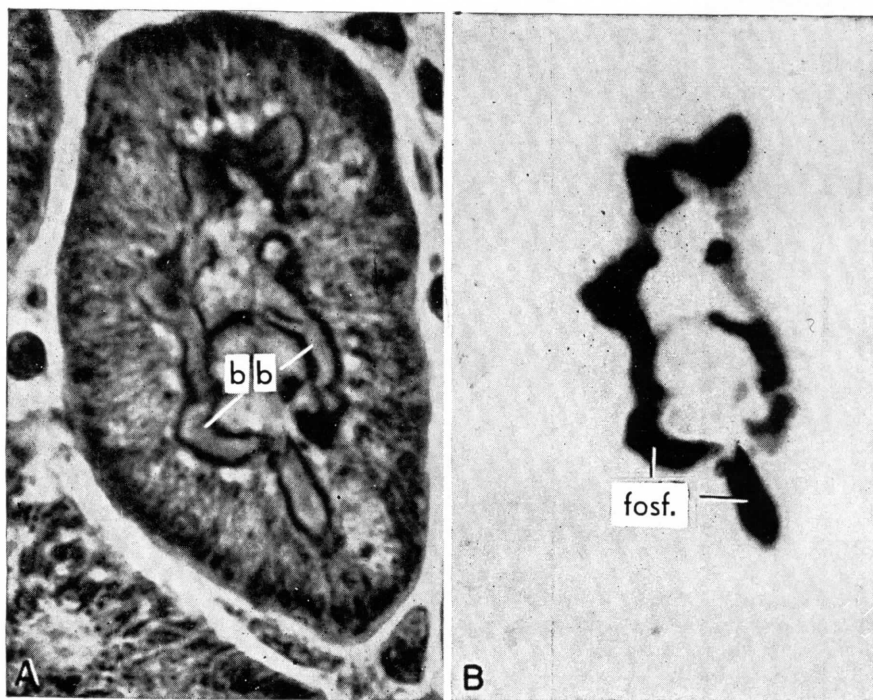


FIG. 7-12. Túbulo contorneado proximal, de riñón de ratón, después de la fijación por congelación y sustitución. A Observación con contraste de fase en un medio de índice de refracción = 1,460. B Examen con luz transmitida. fosf., reacción de la fosfatasa alcalina. (Cortesía de B. J. Davies y L. Ornstein.)

éstos, sólo el último, que implica la producción de un colorante cromogénico de formazán insoluble, ha sido satisfactorio.

La figura 7-15 representa en forma general el mecanismo de acción de estas reacciones histoquímicas, y la figura 7-13, A, pone

de manifiesto a la láctico-deshidrogenasa en las células parietales del estómago. Muchas de las reacciones enzimáticas estudiadas en estas secciones fueron adaptadas para el uso del microscopio electrónico y se darán algunos ejemplos en diferentes capítulos.

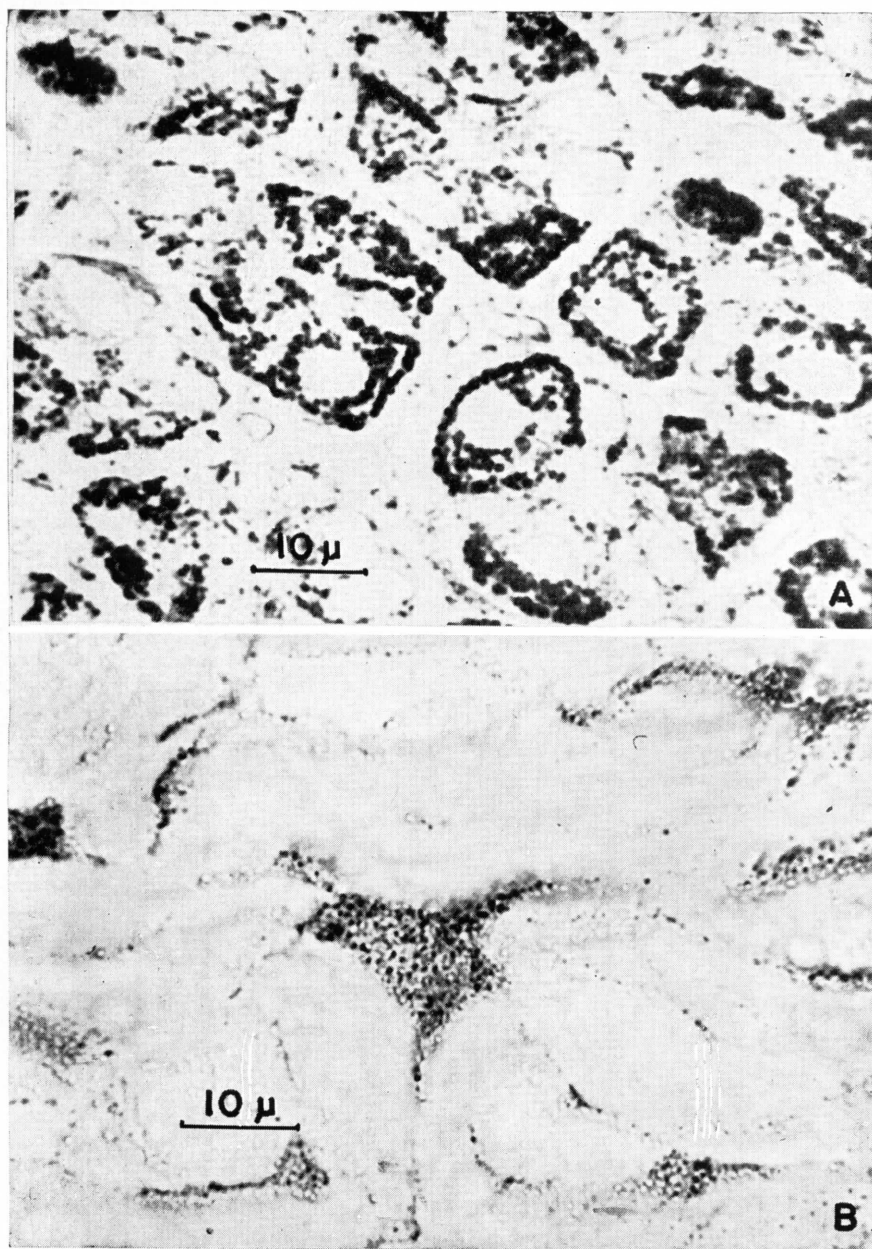


FIG. 7-13. Demostración citoquímica de la láctico-deshidrogenasa en células parietales de estómago de rata: el formazán insoluble, producido por esta reacción, delimita a las mitocondrias. 1500 $\times$. B Actividad de aminopeptidasa en fibroblastos de la dermis de la rata. 1500 $\times$. (Cortesía de B. Monis.)

Métodos histoquímicos basados en determinaciones físicas

Métodos citofotométricos

Diversos componentes de las células poseen la propiedad de absorber específicamente la luz ultravioleta. Así, los ácidos nucleicos absorben en la banda de 2600 Å mientras las proteínas lo hacen en la de 2800 Å (fig. 7-16). También algunas reacciones histoquímicas de coloración dan absorción específica en el espectro visible y pueden analizarse cuantitativamente por medio de instrumentos denominados *citofotómetros*.

En la figura 7-17 se esquematiza un aparato típico para absorción citofotométrica. Cambiando la fuente luminosa y el sistema óptico, puede usarse este instrumento tanto para la luz ultravioleta como para el espectro visible. La absorción se mide directamente por medio de un fotomultiplicador o por densimetría sobre placas fotográficas calibradas. En la tabla 7-1 están indicadas algunas de las reacciones histoquímicas susceptibles de estudiarse por análisis *citofotométrico*.

La absorción específica del ácido nucleico se debe a la presencia de las bases púricas y pirimídicas y, por tanto, es común al ADN y ARN y a los nucleótidos (tabla 7-1). Ambos métodos histoquímicos se complementan entre sí. La citofotometría con luz ultravioleta permite la localización de los dos tipos de

ácidos nucleicos sin distinguirlos entre sí (figura 7-16). La reacción nuclear revela la presencia del ADN (fig. 7-4). Por comparación de los resultados de cada método es posible determinar la topografía del ARN.

La reacción nuclear de Feulgen puede ser adaptada para determinaciones cuantitativas del ADN en cortes de tejido. Con esta finalidad se utiliza la luz monocromática a 5500 Å que corresponde a la absorción máxima de dicho colorante.⁵⁶⁻⁶⁰ En ciertas condiciones cabe expresar los resultados en valores absolutos, pero en general el método mide cantidades relativas de ADN. La clásica reacción de Millon puede emplearse para determinar el contenido proteico (tabla 7-1).

Microincineración (espodografía)

Este método ha sido utilizado ampliamente en el estudio de los componentes minerales de la célula. Consiste en someter el corte de tejido a una temperatura de alrededor de 525°C y en observar las cenizas mediante el microscopio de campo oscuro.

Con la excepción de los óxidos de hierro que dan un color rojizo, los otros componentes minerales no pueden ser identificados. Algunas veces se reconocen partículas de sílice con el microscopio de polarización. Los espodogramas evidencian que las estructuras que tienen ácidos nucleicos, poseen también grandes cantidades de ceniza. Ello se ha atribuido al contenido en fosfato.

La microincineración fue aplicada también a la microscopía electrónica. En algunos casos se incinera el espécimen mediante el bombardeo con el haz electrónico; en otros, se lo coloca directamente sobre el

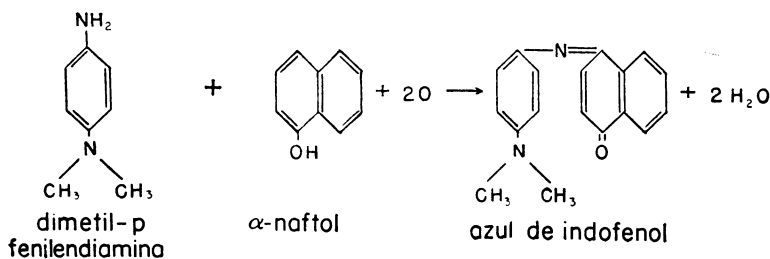


FIG. 7-14. Reacción de Nadi para la citocromooxidasa.

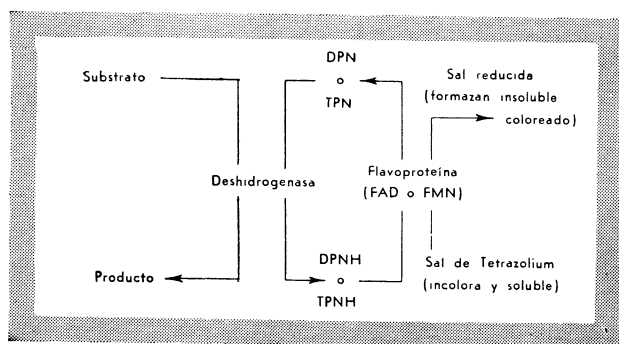


FIG. 7-15. Representación esquemática de la transferencia de electrones a la sal de tetrazolium. FAD, flavino-adenina-dinucleótido; DPN, difosfopiridinnucleótido; TPN, trifosfopiridinnucleótido.

cátodo, obteniéndose una imagen por emisión. Por medio de la difracción de electrones puede recogerse información adicional sobre la composición química de la ceniza.

Microscopia de fluorescencia en histoquímica

En este método, los cortes de tejido son examinados con luz ultravioleta, cerca del

espectro visible, y los componentes se reconocen por la fluorescencia que emiten en el espectro visible. Se estudian dos tipos de fluorescencia: 1) la fluorescencia natural o autofluorescencia, que resulta de sustancias halladas normalmente en los tejidos, 2) y la fluorescencia secundaria inducida por coloración con colorantes fluorescentes, denominados *fluorocromos*.

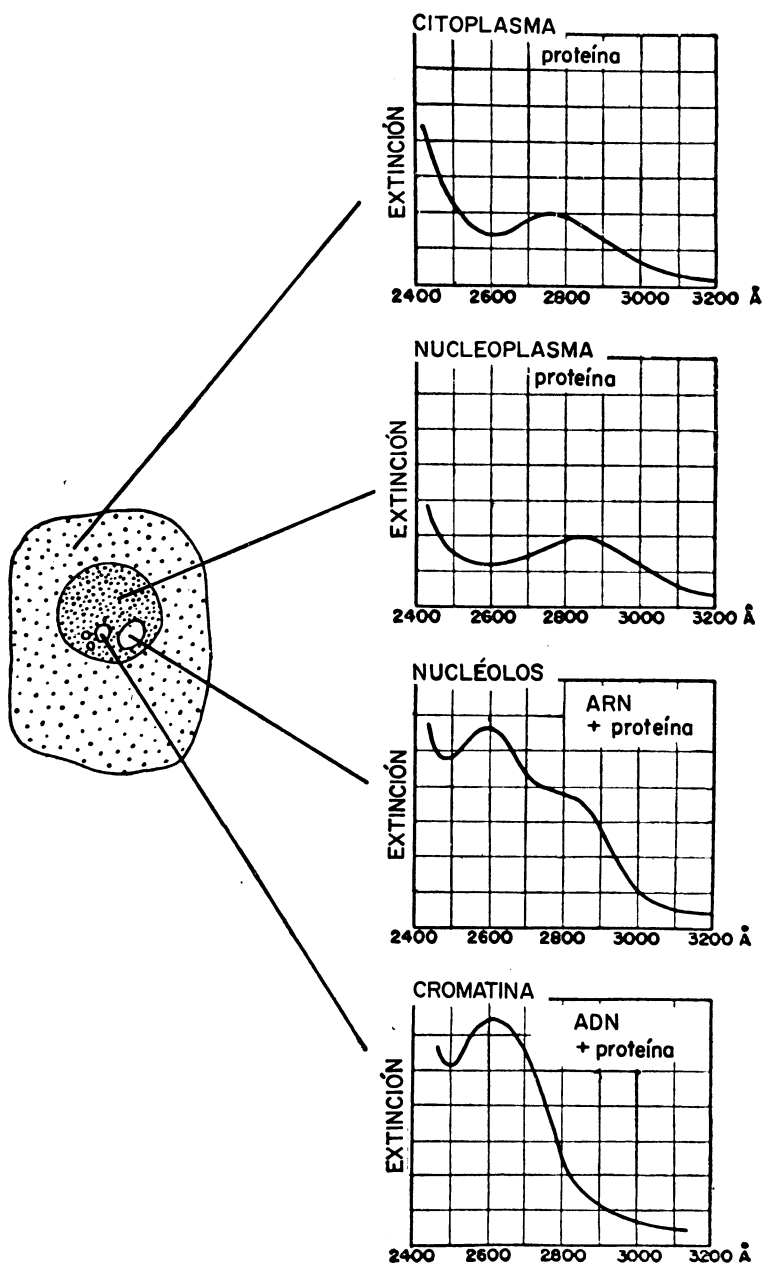


FIG. 7-16. Espectro de absorción ultravioleta del citoplasma, jugo nuclear, nucléolo y cromatina. Se indica la extinción a diversas longitudes de onda. (De Caspersson, 1950.)

Diferentes proteínas pueden ser marcadas con colorantes fluorescentes sin que se desnaturalicen sus moléculas, de modo que al inyectarse en un animal es posible localizarlas histológicamente. Con este método ha sido estudiada la resorción de proteínas séricas homólogas y heterólogas por el riñón, así como

su distribución general fuera del torrente circulatorio.⁷³

La ventaja más importante de la microscopia de fluorescencia es su gran sensibilidad, lo cual tiene particular importancia para los estudios vitales, puesto que la baja concentración de colorante fluores-

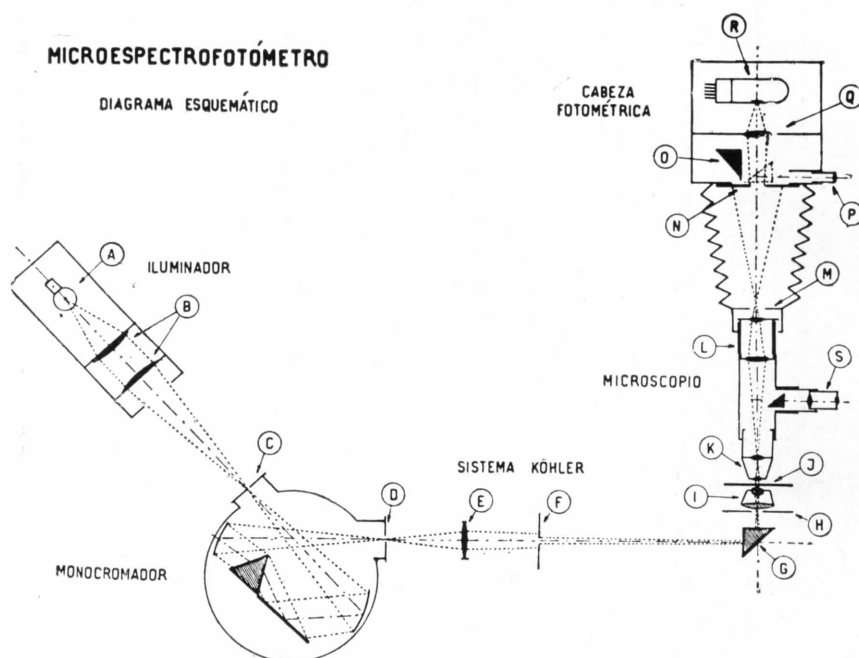


FIG. 7-17. Microespectrofotómetro instalado en el Instituto de Anatomía General y Embriología. La fuente luminosa muestra la lámpara de tungsteno (A) y las lentes del condensador (B); C y D, rendijas de entrada y salida del monocromador; E, lente; F, diafragma; G, prisma; H, diafragma; I, condensador; J, preparado; K, objetivo; S, observación lateral; L, ocular; M y N, diafragmas; O, prisma para la observación de la imagen final; Q, lente; R, fotomultiplicador. (Cortesía de Pogo y Cordero Funes.)

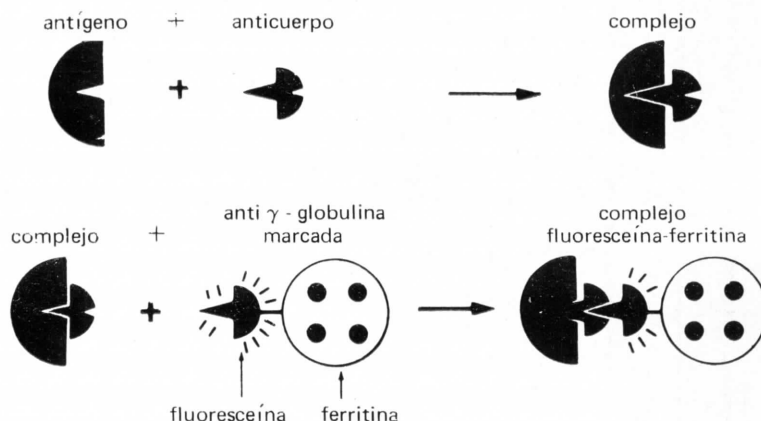


FIG. 7-18. Esquema de los principios generales utilizados en los métodos inmunocitológicos. Arriba. Reacción antígeno-anticuerpo. Abajo. Método indirecto en el que la antigammaglobulina (anticuerpo) se marca con fluoresceína o ferritina. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de W. Bernhard.)

cente necesaria produce una interferencia mínima con la fisiología normal del tejido.

La fluorescencia proporciona a menudo una información citoquímica específica debido a que algunos componentes del tejido poseen una emisión fluorescente típica. Tanto es así que se ha podido descubrir la presencia de vitamina A, tiamina, riboflavina y otras sustancias. El valor citoquímico del método aumenta considerablemente con el análisis espectrográfico de la radiación.⁷⁴ A veces se han podido determinar algunas sustancias incorporadas a la célula; por ejemplo, las sulfonamidas.⁷⁵

El tipo más común de autofluorescencia en el citoplasma es débil, difusa y azulada, siendo amarilla y más intensa en las granulaciones; generalmente, el núcleo no es fluorescente. Las mitocondrias del hígado y del riñón dan una fuerte fluorescencia; los depósitos de calcio aparecen de color amarillo claro y las porfirinas libres tienen una intensa fluorescencia roja. Una aplicación importante se refiere a los pigmentos lipogénicos que se encuentran en numerosas células y que aumentan con la edad. Se piensa que estos pigmentos representan diversos grados de oxidación y polimerización de los ácidos grasos no

saturados. Por medio de la fluorescencia se pueden demostrar dos tipos de pigmentos, la *lipofucsina* y el *ceroide*.⁷⁶

La vitamina A da una fluorescencia verde o amarilla que desaparece rápidamente con la irradiación. La fluorescencia se ha empleado además para la determinación de otras vitaminas y algunas hormonas.⁷⁶

Un importante avance lo constituye la introducción de la fijación en paraformaldehído, que en tejidos congelados y desecados se condensa con la catecolamina y la indolamina, dando fluorescencia verde y amarilla, respectivamente.⁷⁷ Esta reacción de fluorescencia ha sido también estudiada con métodos microespectrográficos.⁷⁸

Inmunocitoquímica

Importantes técnicas citoquímicas han sido desarrolladas para la localización de antígenos con los microscopios óptico y electrónico. Los anticuerpos son producidos por los plasmocitos contra la mayoría de las macromolé-

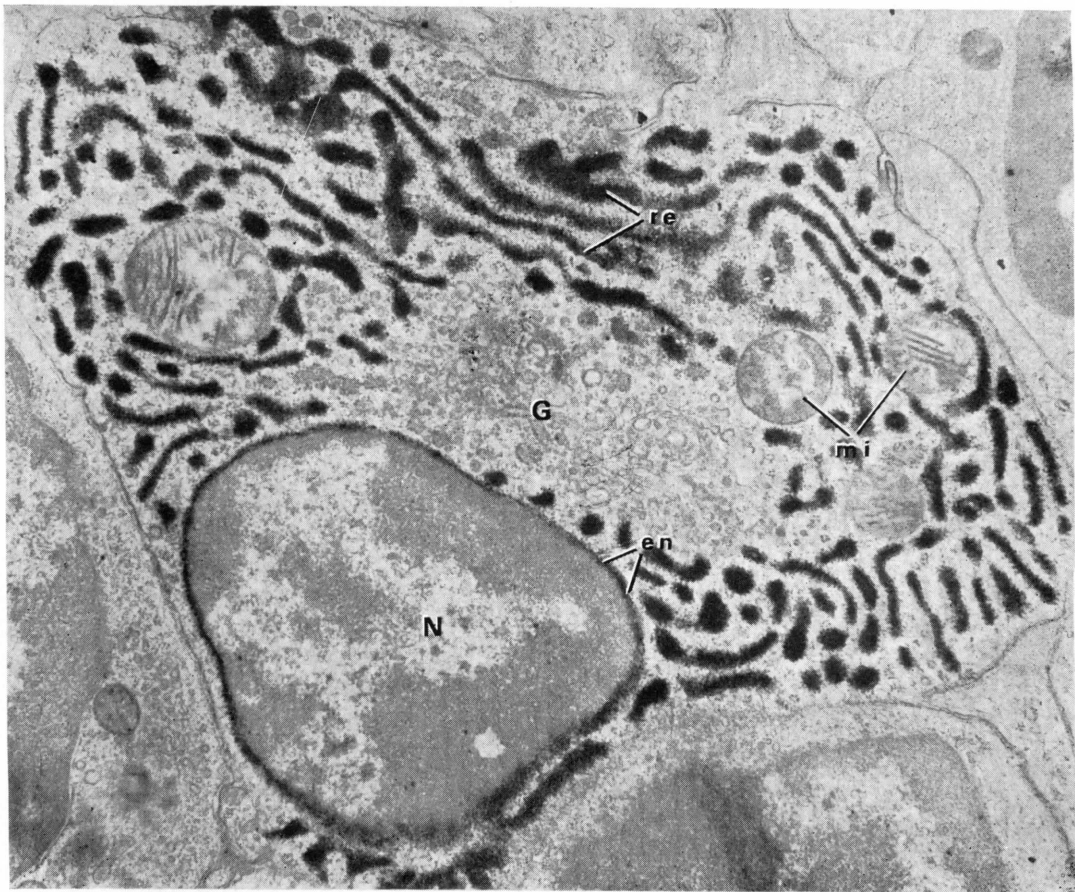


FIG. 7-19. Fotomicrografía electrónica de un plasmocito inmaduro, que muestra la localización de los anticuerpos antiperoxidasa en las cisternas del RE (re) y en la envoltura nuclear (en). El complejo de Golgi no contiene anticuerpos en este momento. mi, mitocondria; N, núcleo. 14,000 $\times$. (Cortesía de E. H. Leduc.)

culas (antígenos) y también contra pequeñas moléculas que se hallan ligadas a especies macromoleculares. Dichos anticuerpos están presentes en la fracción γ -globulina y tienen en general una constante de sedimentación de 6 S.

La figura 7-18 evidencia el principio general de algunas de las técnicas citoquímicas que incluyen el uso de anticuerpos marcados. En la parte superior se ve un antígeno ligándose a un anticuerpo no marcado con el que forma un complejo. Una *reacción directa* similar se produce uniendo la γ -globulina a un colorante fluorescente o a una molécula opaca al haz de electrones. En la mitad inferior de la figura se indica el *método indirecto*, que es el más comúnmente utilizado. En éste, el complejo antígeno-anticuerpo, no marcado, reacciona con un anticuerpo antiglobulina, marcado con fluoresceína para hacer visible el complejo con el microscopio de fluorescencia,⁷⁹ o con ferritina, para su observación con microscopio electrónico.

Los anticuerpos marcados con ferritina, macromolécula de 85 A de diámetro, 650,000 de peso molecular y un contenido de hierro del 23 por ciento, son fácilmente identificables con el microscopio electrónico, como conse-

cuencia de las cuatro condensaciones, de alrededor de 15 A cada una, que posee.⁸⁰

Este método puede ser usado tanto en forma directa como indirecta para localizar virus en los tejidos y para determinar la secreción de γ -globulina por los plasmocitos. Otro aporte al respecto ha sido la inmunización del animal contra la ferritina y la determinación posterior de los sitios de producción del anticuerpo mediante la exposición de cortes de nódulos linfáticos al agente antigénico, la ferritina.⁸¹

Un método similar puede utilizarse para inmunizar conejos contra diferentes enzimas, como la fosfatasa alcalina⁸² y la peroxidasa⁸³ (fig. 7-19). En este último caso, los cortes son expuestos a la enzima y ésta a su vez es revelada por el método de DAB (véase *Oxidación*). Se ha demostrado que los anticuerpos antiperoxidasa aparecen primero en el espacio perinuclear y luego se acumulan en las cisternas del retículo endoplásmico granular y algunas porciones lamelares del complejo de Golgi. Para una revisión de la Inmunocitoquímica al nivel del microscopio electrónico, consúltese⁸⁴.

En la reacción de Coons, los anticuerpos presentes en el suero se unen con isocianato

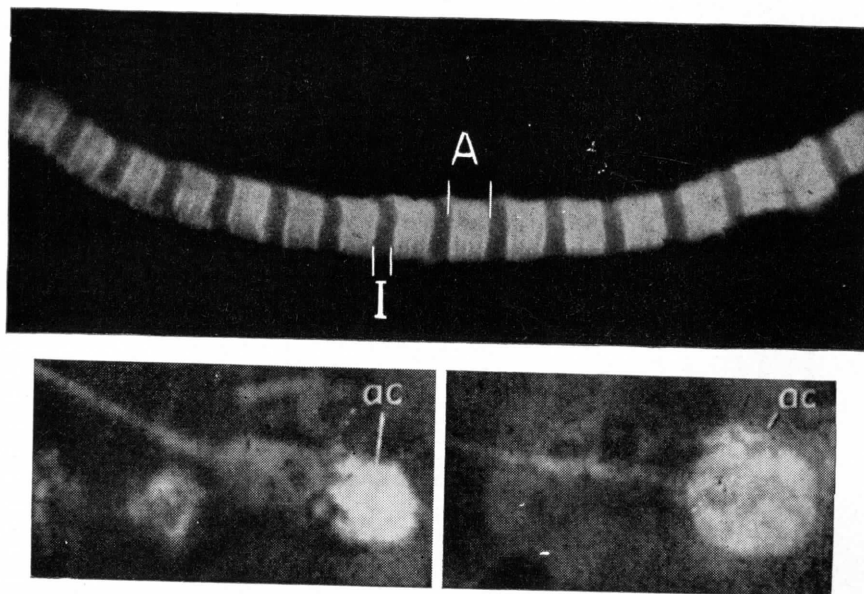


FIG. 7-20. Arriba, Miofibrilla estriada aislada y teñida con un anticuerpo contra la miosina, marcado con fluoresceína. Se observa que el antígeno (miosina) se halla localizado exclusivamente en la banda A. Observación con el microscopio de fluorescencia. (Cortesía de H. Marshall.) Abajo. A la izquierda, espermatozoide de toro y, a la derecha, de cobayo incubados con el anticuerpo correspondiente a la hialuronidasa. Véase que en ambos casos la fluorescencia brillante se encuentra localizada en el acrosoma, ac. 1250 $\times$. (Cortesía de R. E. Mancini.)

de fluoresceína. Los tejidos se congelan y se cortan en el crióstato (fig. 7-2); luego los cortes se adhieren a los portaobjetos, se secan a la temperatura ambiente y se colorean con el anticuerpo marcado. Este método se adoptó para la localización de virus y antígenos bacterianos. También fue posible localizar los anticuerpos en el sitio de su formación dentro de las células plasmáticas.⁷⁹

Entre los trabajos de interés citoquímico se encuentran aquellos que demuestran que la ACTH hipofisaria se localiza en las células basófilas de la glándula.⁸⁵ Por medio de esta técnica se localizaron diversas enzimas producidas por el páncreas.^{86, 87} En la figura 7-20 se ejemplifica el grado de localización que puede alcanzarse con la técnica de Coons en el músculo y en el espermatozoide. La miofibrilla ha sido coloreada con un anticuerpo en contra de la miosina y se demuestra que esta proteína está localizada estrictamente en las bandas A (véase, también, cap. 23).

Radioautografía en Citoquímica

Uno de los métodos más importantes de la moderna Citoquímica se basa en el uso de sustancias marcadas con radioisótopos. La

sustancia en cuestión es incorporada a la célula y luego se la localiza utilizando una emulsión fotográfica, puesto que los radioisótopos tienen la propiedad de actuar sobre los cristales de bromuro de plata de la emulsión. El corte de tejido se pone en contacto con la emulsión fotográfica durante cierto período y después la radioautografía se revela como en el método fotográfico común. Comparando la imagen fotográfica con la de las células observadas por medio del microscopio, se puede tener una localización precisa del radioisótopo.

Los radioisótopos usados en radioautografía emiten uno o más de los tres tipos de radiación: partículas α y β y radiaciones γ . Las partículas α son núcleos de helio cargados positivamente que originan trayectos rectos en la emulsión; el punto de origen de ellos puede reconocerse con facilidad. Tienen, sin embargo, poca importancia biológica debido principalmente a que son producidos por metales pesados. Las radiaciones γ carecen de importancia en radioautografía.

Las partículas β son electrones que pueden tener niveles diferentes de energía. Los trayectos de estas partículas son tortuosos y varían en longitud desde pocos micrones hasta

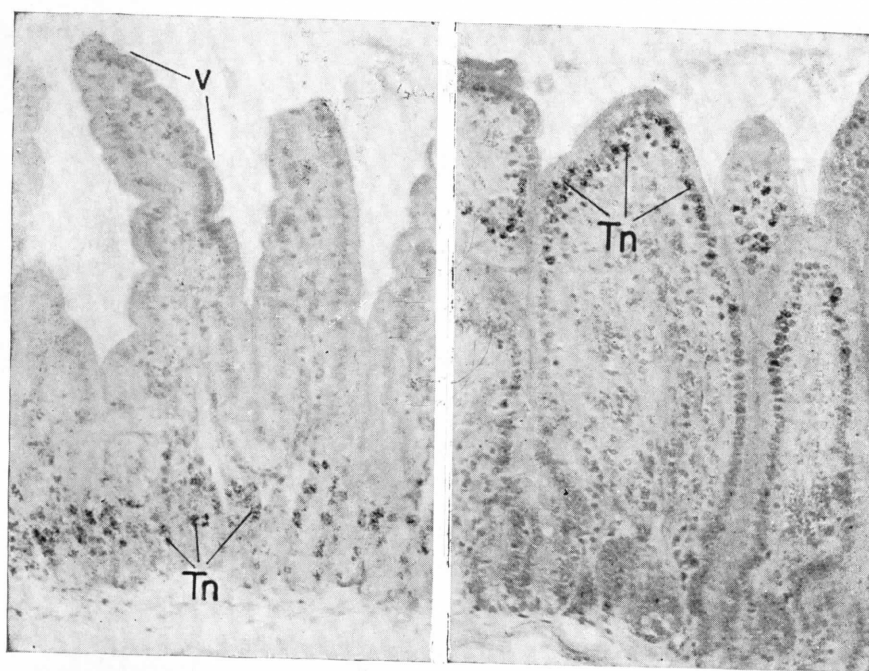


FIG. 7-21. Corte de intestino de ratón inyectado con timidina tritiada. A la izquierda, sacrificado a las 8 horas de la inyección y a la derecha, sacrificado a las 36 horas. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de C. P. Leblond.)

un milímetro, de acuerdo con su energía. La mayoría de los isótopos empleados son emisores β .^{88, 91}

En el método del *stripping film* se emplea una emulsión de $5\ \mu$ sobre una base de gelatina de $10\ \mu$ de espesor.⁹² La película se separa de la placa de vidrio y se hace flotar sobre un baño de agua. Luego el corte, que está montado sobre un portaobjeto, es sumergido por debajo de la película que flota en la superficie. Cuando se saca el espécimen, la emulsión cubre a la preparación estrechamente. Al cabo de exposiciones, que varían en su duración de varias semanas a meses, la radioautografía se revela. Pueden obtenerse resultados cuantitativos determinando la densidad de la radioautografía por distintos métodos ópticos,⁹³ o contando los granos.⁹⁰

Han sido usadas ampliamente en radioautografía sustancias marcadas con C^{14} emisor β . Con tal emisor es factible realizar también la *radioautografía de trayecto*,⁹⁴ que consiste en aplicar una gruesa emulsión líquida en vez de una película fotográfica. Con esta técnica el contacto resulta aún más íntimo y es posible seguir y contar cada uno de los trayectos de la emisión β que proviene de un área defi-

nida, permitiendo así una estimación cuantitativa. La resolución de este método es del orden de 1 a $2\ \mu$.

Las determinaciones químicas de las sustancias marcadas con el isótopo pueden hacerse indirectamente por medio de métodos de extracción o enzimas específicas. Así, por ejemplo, se utilizan la ribonucleasa y la hialuronidasa para marcar los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos.

Las sustancias marcadas con tritio (H^3), que es un emisor β blando, son las de uso más difundido en radioautografía. La timidina tritiada se aplica al estudio del metabolismo del ADN, puesto que esta base es específica para dicho ácido.

Con el empleo de precursores apropiados se realizaron importantes investigaciones acerca del mecanismo de duplicación del ADN (véase cap. 17) y del metabolismo del ARN.

En el ejemplo expuesto en la figura 7-21, los núcleos marcados con timidina tritiada y que se encuentran en el fondo de las criptas intestinales están al cabo de 36 horas cerca del extremo de la vellosidad. Estos resultados indican de manera gráfica el ciclo vital de una célula. Una vez que éstas se dividen en

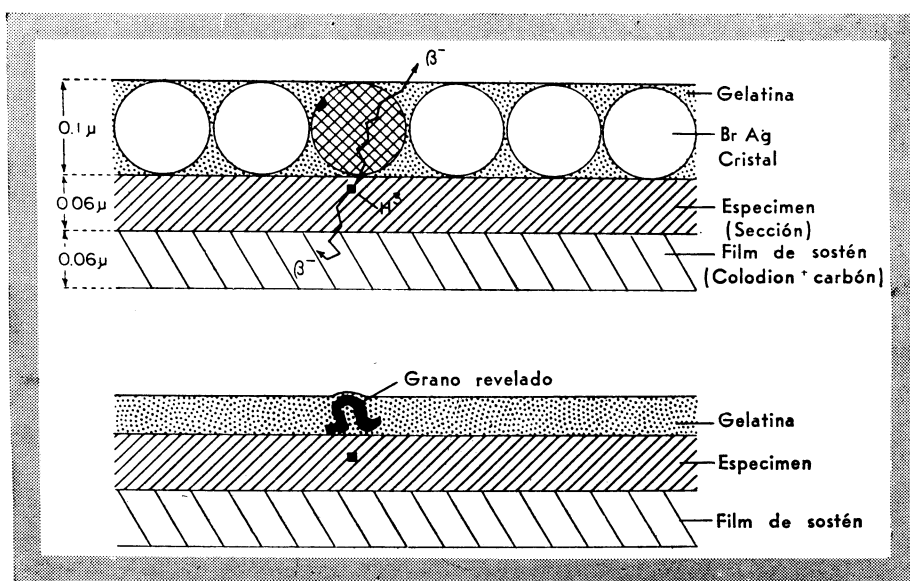


FIG. 7-22. Representación esquemática de una preparación radioautográfica examinada con el microscopio electrónico. Arriba, durante la exposición: Los cristales de halogenuro de plata que se encuentran en una matriz gelatinosa cubren el corte; una partícula beta, de un átomo de tritium en el espécimen, choca con un cristal (línea de cruces), causando la aparición de una imagen latente sobre la superficie. Abajo, examen después del revelado: El cristal expuesto se ha desenrollado en un filamento de plata; los cristales no expuestos se disolvieron. (Cortesía de L. G. Caro.)

el fondo de la cripta, ascienden a lo largo del epitelio para ser finalmente destruidas después de pocas horas en el extremo de la vellosidad.

Se ha desarrollado una radioautografía con doble emulsión que permite distinguir las partículas emitidas por el C^{14} de las de los átomos H^3 . Con este método se pueden emplear simultáneamente precursores tritiados de ADN y precursores de ARN o de proteínas marcadas con C^{14} .⁹⁵

En los últimos años la técnica de radioautografía

de sustancias marcadas con tritio fue llevada al nivel del microscopio electrónico. Se aplican emulsiones líquidas delgadas sobre cortes finos, formando una sola capa de cristales de bromuro de plata (fig. 7-22). Después de una revelación apropiada, los granos de plata impresionados por la emulsión β se destacan sobre la imagen del microscopio electrónico (fig. 7-23). Se ha podido llegar a una resolución del orden de 0.1μ ($1000 \text{ \AA}$).^{91, 96}

Para consultar actualizaciones sobre radioautografía al nivel del microscopio electrónico, véase ^{97, 99}

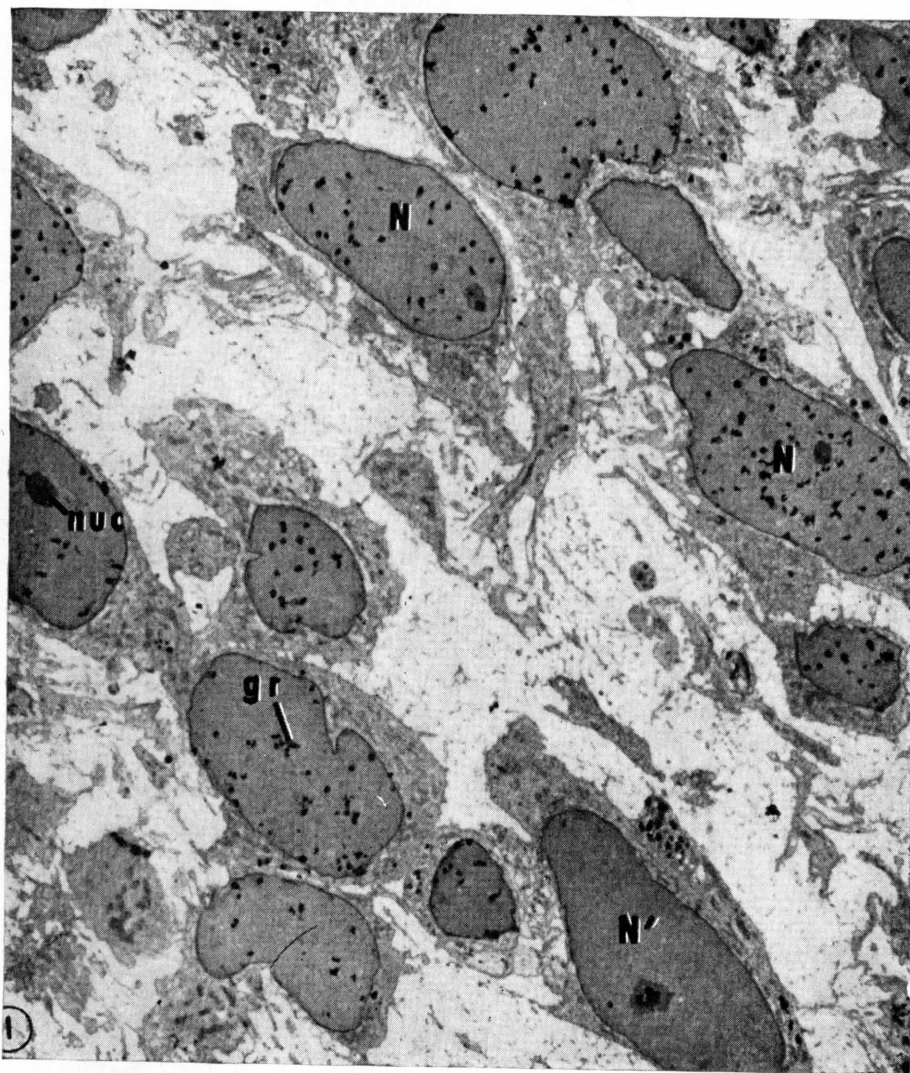


FIG. 7-23. Fotomicrografía, con poco aumento, de células en regeneración de una extremidad de la salamandra. Tejido fijado una hora después de la inyección de $5 \mu\text{c}$ de timidina- H^3 . Los núcleos (N) están marcados por los gránulos de plata revelados (gr). Algunos núcleos (N') no están marcados; nuc, nucléolo, $2000 \times$. (Cortesía de E. D. Hay y J. P. Revel.)

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Allfrey, V. G.: (1959) The isolation of subcellular components. In: *The cell*, vol. 1, p. 193. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Anderson, N. G. (ed.): (1966) The development of zonal centrifuges. *Nat. Cancer Inst. Monog.*, 21 Bethesda Md.
- Brachet, J.: (1957) *Biochemical Cytology*. Academic Press, New York.
- Burstone, M. S.: (1962) *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*. Academic Press, New York.
- Coons, A. H.: (1956) Histochemistry with labeled antibody. *Int. Rev. Cytol.*, 5:1.
- Danielli, J. F.: (1953) *Cytochemistry, a critical approach*. John Wiley & Sons, New York.
- Deane, H. W.: (1958) Intracellular lipids: their detection and significance. In: *Frontiers in Cytology*. (Palay, S. L., ed.) Yale University Press, New Haven, Conn.
- Engström, A.: (1956) Historadiography. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 489. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
- Ficq, A.: (1959) Autoradiography. In: *The cell*, vol. 1, p. 67. (Brachet J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Glick, D.: (1959) Quantitative microchemical techniques of histology and cytochemistry. In: *The cell*, vol. 1, p. 139. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Gomori, G.: (1952) *Microscopic histochemistry*. University of Chicago Press, Chicago.
- Hale, A. J.: (1957) The histochemistry of polysaccharides. *Int. Rev. Cytol.*, 6:194.
- Heidelberg, M.: (1967) Some contributions of immunochemistry to biochemistry and Biology. *Ann. Rev. Biochem.*, 36, part 1, 1.
- Lison, L.: (1960) *Histochimie et cytochimie animale*. 3rd ed. Gauthier-Villars, Paris.
- Pearse, A. G. E.: (1960) *Histochemistry, theoretical and applied*. 2nd ed. J. & A. Churchill, London.
- Price, G. and Schwartz, S.: (1956) Fluorescence microscopy. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 91. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
- Singer, M.: (1952) Factors which control the staining of tissue sections with acid and basic dyes. *Int. Rev. Cytol.*, 1:211.
- Swift, H.: (1953) Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.*, 2:1.
- Taylor, J. H.: (1958) The duplication of chromosomes. *Scient. Amer.*, 198(6):36.
7. Puck, T. T. and Marcus, P. I.: (1956) *J. exp. Med.*, 103:653.
8. Puck, T. T. and Marcus, P. I. and Cieciura, S. J.: (1956) *J. exp. Med.*, 103:273.
9. Sato, G., Fisher, H. W. and Puck, T. T.: (1957) *Science*, 126:961.
10. Chambers, R.: (1940) *J. roy micr. Soc.*, 60:113.
11. Chambers, R.: (1949) *Biol. Rev.*, 24:2346.
12. Sabatini, D. D., Bensch, K. G. and Barnett, R. J.: (1962) New Fixatives for cytological and cytochemical studies. In: *Fifth International Congress on Electron Microscopy*, vol. 2, L-3. Academic Press, New York.
13. Wolman, M.: (1955) *Int. Rev. Cytol.*, 4:79.
14. Gersh, I.: (1959) Fixation and staining. In: *The Cell*, vol. 1, p. 21. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
15. McClung, C. E. (ed.): (1950) *Handbook of microscopical technique*. 3rd ed. Paul B. Hoeber, New York.
16. Bensley, R. R. and Bensley, S. A.: (1941) *Handbook of histological and cytological technique*. University of Chicago Press, Chicago.
17. Porter, K. R. and Kallman, F.: (1953) *Exp. Cell Res.*, 4:127.
18. Bahr, G. F.: (1954) *Exp. Cell Res.*, 7:457.
19. Palade, G. E.: (1952) *J. exp. Med.*, 95:285.
20. De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:785.
21. Fernández-Morán, H. and Finean, J. B.: (1957) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 3:725.
22. Engström, A. and Finean, J. B.: (1958) *Biological ultrastructure*. Academic Press, New York.
23. Singer, M. and Morrison, P. R.: (1948) *J. biol. Chem.*, 175:1, 133.
24. Singer, M.: (1954) *J. Histochem. Cytochem.*, 2:5, 322.
25. Alfert, M. and Geschwind, I. I.: (1953) *Proc. nat. Acad. Sci (Wash.)*, 39:991.
26. Schubert, M. and Hamermann, D.: (1956) *J. Histochem. Cytochem.*, 4:158.
27. Michaelis, L. and Granick, S.: (1945) *Amer. Chem. Soc.*, 67:1212.
28. Sylven, B.: (1954) *Quart. J. micr. Sci.*, 95:327.
29. Lison, L.: (1960) *Histochimie et cytochimie animale*. 3rd ed. Gauthier-Villars, Paris.
30. Casselman, W. G. B.: (1959) *Histochemical technique*. Butler & Tanner, London.
31. Pearse, A. G. E.: (1960) *Histochemistry: theoretical and applied*. J. & A. Churchill, London.
32. Glick, D.: (1959) Quantitative microchemical techniques of histo- and cytochemistry. In: *The cell*, vol. 1, p. 139. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
33. Burstone, M. S.: (1952) *Enzyme histochemistry*. Academic Press, New York.
34. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lorez Arnaiz, G. and Salganicoff, L.: (1962) *J. Neurochem.*, 9:23.
35. Kuff, E. L., Hogeboom, G. H. and Dalton, A. J.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:1, 33.
36. Anderson, N. G.: (1956) Techniques for the mass isolation of cellular components. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 300. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
37. Albertsson, P.: (1960) *Partition of cell particles and macromolecules*. John Wiley & Sons, New York.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Rinaldini, L. M. J.: (1958) *Int. Rev. Cytol.*, 7:587.
2. Parker, P. C.: (1961) *Methods of tissue culture*. 3rd ed. Paul B. Hoeber, New York.
3. Cameron, G.: (1950) *Tissue culture technique*. Academic Press, New York.
4. Moscona, A.: (1952) *Exp. Cell Res.*, 3:535.
5. Dulbecco, R.: (1952) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 38:747.
6. Earle, W., Evans, V. and Schilling, E.: (1950) *J. nat. Cancer Inst.*, 10:943.

38. Holter, H. and Linderström-Lang, K.: (1940) Enzymatische Histochemie. In: *Handbuch der Enzymologie*. (Nord and Weidenhagen, eds.) Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
39. Kirk, P. L.: (1950) *Quantitative ultramicroanalysis*. John Wiley & Sons, New York.
40. Eränkö, Q.: (1955) *Quantitative methods in histology and microscopic histochemistry*. Little, Brown and Co., Boston.
41. Lowry, O. H.: (1957) Micromethods for the assay of enzymes. In: *Methods in enzymology*, vol. 4. (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.) Academic Press, New York.
42. Zeuthen, E.: (1946) *Comp. Rend. Lab. Carlsberg*, serie chim., 25:191.
43. Holter, H. and Zeuthen, E.: (1948) *Comp. Rend. Lab. Carlsberg*, serie chim., 26:7, 243.
44. Edström, J. E. and Hyden, H.: (1954) *Nature*, 174:128.
45. Edström, J. E.: (1956) *Biochim. biophys. Acta*, 22:378.
46. Danielli, J. F.: (1953) *Cytochemistry, a critical approach*. John Wiley & Sons, New York.
47. Bennett, H. S.: (1951) *Anat. Rec.*, 110:231.
48. Bennett, H. S. and Watts, R. M.: (1958) The cytochemical demonstration and measurement of sulphydryl groups by Azo-Aryl mercaptide coupling, with special reference to mercury orange. In: *General cytochemical methods*, vol. 1, p. 317. (Danielli, J. F., ed.) Academic Press, New York.
49. Kawamura, N. and Dan, K.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:5, 615.
50. Barnett, R. J. and Seligman, A. M.: (1954) *J. nat. Cancer Inst.*, 14:769.
51. Barnett, R. J. and Seligman, A. M.: (1955) *J. Histochem. Cytochem.*, 3:406.
52. Cafruny, E. J., Di Stefano, H. S. and Farah, A.: (1955) *J. Histochem. Cytochem.*, 3:354.
53. Flax, M. H. and Himes, M. H.: (1952) *Physiol. Zool.*, 25:297.
54. Sáez, F. A.: (1951) *Anat. Rec.*, 113:306.
55. Kurnick, N. B.: (1950) *Exp. Cell Res.*, 1:151.
56. Di Stefano, H.: (1948) *Chromosoma*, 4:282.
57. Lessler, M. A.: (1953) *Int. Rev. Cytol.*, 2:231.
58. Moses, M. J.: (1952) *Exp. Cell Res.*, suppl. 2:76.
59. Brachet, J.: (1957) *Biochemical Cytology*. Academic Press, New York.
60. Stowell, R. E.: (1946) *Stain Technol.*, 21:137.
61. McManus, F. A.: (1946) *Nature*, 158:202.
62. Etcheverry, M. A. and Mancini, R. E.: (1948) *Rev. Soc. argent. Biol.*, 48:136.
63. Baker, J. R.: (1944) *Quart. J. micr. Sci.*, 85:1.
64. Baker, J. R.: (1946) *Quart. J. micr. Sci.*, 87:441.
65. Danielli, J. F.: (1949) *Quart. J. micr. Sci.*, 90:67.
66. Gomori, G.: (1952) *Microscopic Histochemistry*. University of Chicago Press, Chicago.
67. Menten, M. L., Junge, J. and Green, M. H.: (1944) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 57:82.
68. Seligman, A. M. et al.: (1949) *Ann. Surg.*, 130:333.
69. Nachlas, M. M. and Seligman, A. M.: (1949) *J. nat. Cancer Inst.*, 9:415.
70. Barnett, R. J. and Seligman, A. M.: (1951) *Science*, 114:579.
71. Koelle, G. B. and Friedenwald, J. S.: (1949) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 70:617.
72. Graham, R. C. and Karnovsky, M. L.: (1966) *J. Histochem. Cytochem.*, 14:291.
73. Seligman, A. M., Karnovsky, M. J., Wasserknig, H. L. and Hanker, J. S.: (1968) *J. cell Biol.*, 38:1.
74. Mancini, R. E.: (1963) *Int. Rev. Cytol.*, 14:193.
75. Sjöstrand, F. S.: (1946) *Acta physiol. scand.*, 8:42.
76. Price, G. and Schwartz, S.: (1956) Fluorescence microscopy. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 91. (Oster, G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
77. Carlsson, A., Falck, B. and Hillarp, N.: (1962) *Acta physiol. scand.*, 56, suppl. 196.
78. Ritzen, M.: (1967) *Exp. Cell Res.*, 44:250 and 45:178.
79. Coons, A. H.: (1956) *Int. Rev. Cytol.*, 5:1.
80. Rifkind, R. A., Osserman, E. F., Shsu, K. C. and Morgan, C.: (1962) *J. exp. Med.*, 116:423.
81. De Petris, S. G., Karlsbad and Pernis, B.: (1963) *J. exp. Med.*, 117:849.
82. Scott, G., Avrameas, S. and Bernhard, W.: (1968) *C. R. Acad. Sc.*, 266:746.
83. Leduc, E. H., Avrameas, S. and Bouteille, M.: (1968) *J. exp. Med.*, 127:109.
84. Stengerger, L. A.: (1967) Electron microscopic immunocytochemistry. *A. Review J. Histochem. Cytochem.*, 15:139.
85. Marshall, J. M., Jr.: (1951) *J. exp. Med.*, 94:21.
86. Marshall, J. M., Jr.: (1954) *Exp. Cell Res.*, 6:240.
87. Holter, H. and Marshall, J. M., Jr.: (1954) *Comp. Rend. Lab. Carlsberg*, serie chim., 29:7.
88. Gross, J., Bogoroch, R., Nadler, N. J. and Leblond, C. P.: (1951) *Amer. J. Roentgenol.*, 65:3, 420.
89. Boyd, G. A.: (1955) *Autoradiography in Biology and Medicine*. Academic Press, New York.
90. Taylor, J. H.: (1956) Autoradiography at the cellular level. In: *Physical techniques in biological research*, vol. 3, p. 546. (Oster G. and Pollister, A. W., eds.) Academic Press, New York.
91. Caro, L.: (1962) *J. Cell Biol.*, 15:189.
92. Howard, A. and Pelc, S. R.: (1951) *Exp. Cell Res.*, 2:178.
93. Mazia, D., Plaut, W. S. and Ellis, G. W.: (1955) *Exp. Cell Res.*, 9:305.
94. Ficq, A.: (1955) *Exp. Cell Res.*, 9:286.
95. Baserga, R. and Nemeroff, K.: (1962) *J. Histochem. Cytochem.*, 10:628.
96. Caro, L. G. and van Tubergen, R. P.: (1962) *J. Cell Biol.*, 15:173.
97. Caro, L. G.: (1964) In: *Methods in Cell Physiology*, 1, p. 327. Prescott, D. M. (ed.) Academic Press, New York.
98. Salpeter, M. M.: (1966) General area of autoradiography at the electron microscope level. In: *Methods in Cell Physiology*, 2, D. M. Prescott (ed.). Academic Press, New York.
99. Stevens, A. R.: (1966) *High resolution autoradiography*, 2, p. 255. Prescott, D. M. (ed.). Academic Press, New York.

CUARTA PARTE

BASES ESTRUCTURALES DE LA CELULA

En los capítulos que siguen se ha tratado de suministrar al lector una idea sumaria de la forma en que los componentes moleculares se organizan para constituir estructuras más complejas, susceptibles de ser analizadas con los diversos instrumentos ópticos. Se pasa así por los distintos niveles de organización, desde el plano molecular al subcelular.

Al hablar de las estructuras elementales (macromoleculares, fibrosas y membranosas), se verá cómo pueden originarse a partir de moléculas que interactúan por medio de diversas fuerzas. En este terreno ha sido muy útil el uso de modelos moleculares para interpretar las imágenes que nos proporciona el microscopio electrónico.

El estudio de la membrana celular se encuentra relacionado, en cierto modo, con dichas estructuras elementales, ya que posee dimensiones macromoleculares. Este estudio permitirá apreciar que, por medio de modelos artificiales de membranas lipoproteicas, es posible obtener un concepto más acabado de la estructura molecular y de las propiedades de las membranas biológicas. Esa investigación comprende asimismo la de las múltiples diferenciaciones que presenta la membrana celular en los diversos tipos celulares. En el capítulo 21 será considerada la fisiología propiamente dicha de la membrana celular; es decir, el estudio de las diversas funciones reunidas con el nombre de permeabilidad celular.

Unidades elementales de estructura en los sistemas biológicos

Los constituyentes moleculares de la célula que fueron descritos en el capítulo 4, pueden asociarse entre sí y organizarse en unidades supramoleculares, las que a su vez son parte de estructuras reconocidas dentro de las células por medio del microscopio electrónico.

Estas *unidades elementales* de estructura son difíciles de estudiar debido a su pequeño tamaño. Con frecuencia se podrá deducir su organización por medio de la aplicación de métodos indirectos y, a veces, de modelos moleculares hechos con sustancias puras.

Las unidades elementales se clasifican, sobre la base de consideraciones geométricas simples, en: a) *unidimensionales (fibrosas)*, cuando las moléculas están asociadas linealmente a lo largo de un solo eje; b) *bidimensionales (membranosas)*, si se extienden en dos dimensiones, formando finas membranas, y c) *tridimensionales*, cuando constituyen partículas cristalinas o amorfas. Todas estas organizaciones moleculares se mantienen mediante fuerzas de interacción fisicoquímica cuyo estudio es de gran interés en Biología.

En ciertos sistemas, las estructuras elementales pueden agregarse para formar tipos superiores de organización, visibles con el microscopio y aun a simple vista. Existe una serie de componentes con este tipo de organización, tanto en tejidos vegetales como en animales. Se dividen en tres categorías: 1) *subcelulares*, que abarcan partes de las células, como las membranas, cilios y cromosomas; 2) *extracelulares*, como las fibras colágenas y elásticas, membranas de celulosa o de quitina situadas por fuera de las células, y 3) *supracelulares*, que incluyen formaciones macroscópicas como el pelo, hueso y músculo, en las cuales existe también una organización supramolecular.

Gran parte de las moléculas descritas en el capítulo 4 son elementos muy delgados (10-30 Å) y sumamente alargados. Entre ellos se encuentran algunas proteínas fibrosas (colágeno, miosina, actina, fibrina, etc.), los ácidos nucleicos (desoxirribonucleico, ADN, y ribonucleico, ARN) y los polisacáridos (celulosa, ácidos hialurónico y condroitinsulfúrico). Muchos de estos componentes están polimerizados, pero a su vez son monómeros de unidades más grandes y pueden unirse por los extremos o interactuar lateralmente para formar estructuras fibrosas, membranosas o cristalinas.

FUNCIONES DE LAS ESTRUCTURAS ELEMENTALES

Las funciones de las estructuras elementales en los sistemas biológicos serán mencionadas a lo largo de este libro, si bien desde el comienzo el lector deberá reconocer su importancia. Algunos de estos sistemas moleculares cumplen *funciones mecánicas*, como las fibras colágenas que forman el tendón, las fibras de fibrina empleadas en la coagulación sanguínea para prevenir la hemorragia o las proteínas musculares que interactúan para producir el acortamiento durante la contracción. Otros tienen *propiedades enzimáticas* que están implicadas en las funciones precedentes; por ejemplo, una parte de la molécula de miosina (meromiosina H) posee una actividad de ATPasa relacionada con la contracción.

Como se menciona en el capítulo 19, una función importante de estos complejos es la de almacenar (codificar) y transmitir *información genética* (sistemas del ADN y ARN). Al respecto puede decirse que la mayoría de las funciones fundamentales de los sistemas bio-

lógicos, como el trabajo osmótico, los potenciales eléctricos, la asociación de células, permeabilidad, oxidaciones, etcétera, se hallan íntimamente vinculadas con estas estructuras básicas.

Conformación molecular de las proteínas

La tabla 8-1 muestra algunas de las proteínas solubles del tipo α (véase cap. 4) que son componentes importantes de los tejidos biológicos. Se advierte que el contenido α -hélice de la cadena polipeptídica varía entre 100 y 30 por ciento. La asimetría de la molécula es, en términos generales, proporcional a dicho contenido. Así, las proteínas musculares (tropomiosina, meromiosina H y L, miosina y paramiosina) tienen un contenido de hélice superior al 50 por ciento y son moléculas alargadas. En cambio, las proteínas globulares presentan una forma más o menos esférica.¹ En el capítulo 22, dedicado al estudio de cilios y microtúbulos, se hace referencia a la asociación de proteínas globulares para formar estructuras alargadas. Por otra parte, en el capítulo 23 se explicará cómo las proteínas musculares se agrupan para formar la maquinaria contáctil macromolecular.

El colágeno como ejemplo de unidad fibrosa

Con el propósito de comprender mejor los principios inherentes a la formación de estos grandes complejos moleculares, tomaremos como ejemplo al colágeno. El colágeno es probablemente una de las proteínas que abundan más en el reino animal. Se sintetiza en los fibroblastos y es una parte importante de la mayoría de los componentes fibrosos del organismo, como la piel, tendón, cartílago y hueso. Los grandes agregados son visibles a simple vista y con el microscopio óptico, pero la estructura íntima que se encuentra al nivel molecular sólo puede establecerse combinando el microscopio electrónico y la difracción de rayos X, con el análisis químico y otras técnicas. Un adelanto importante fue el descubrimiento que las fibras de colágeno se pueden disociar en unidades cada vez más pequeñas por diversos tratamientos (por ejemplo, la acción de ácidos), y que éstas son capaces de agruparse nuevamente.

La molécula básica tiene un peso de 360,000,² una longitud de unos 2800 Å y un ancho de 14 Å. Está constituida por tres ca-

denas arrolladas entre sí, de manera helicoidal,^{3, 4} como se demuestra esquemáticamente en la figura 8-1. Es interesante recordar que el colágeno tiene aminoácidos más bien simples en su molécula. Alrededor de una tercera parte está constituida por glicina, otro tercio por prolina e hidroxiprolina y el resto por aminoácidos distintos.

Esta unidad molecular de colágeno, denominada también tropocolágeno, se puede considerar como un monómero macromolecular,^{5, 7} debido a que es susceptible, por interacción, de transformarse o constituir diferentes estructuras de colágeno. La molécula de tropocolágeno, con las dimensiones dadas anteriormente, se piensa que es asimétrica o polarizada porque tiene una secuencia lineal definida de sus aminoácidos en las cadenas intramoleculares. En realidad, con respecto a su interacción estas moléculas se comportan como si poseyeran una "cabeza" y una "cola" (figura 8-2).

Los estudios de la *fibra de colágeno* natu-

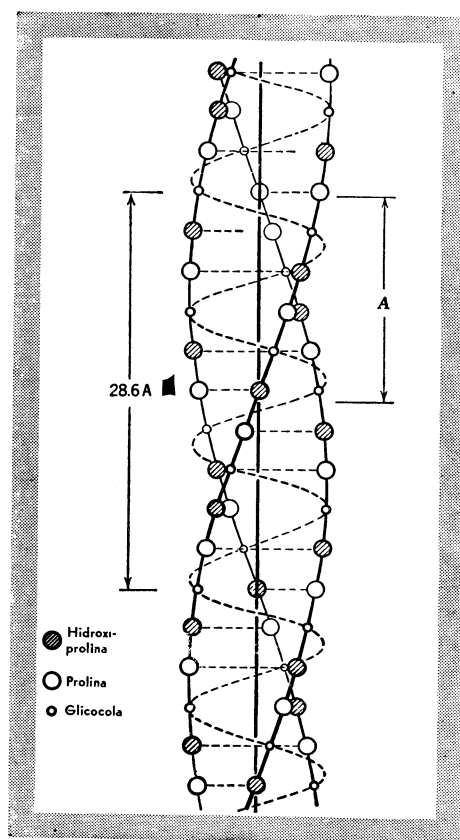


FIG. 8-1. Estructura de la molécula del colágeno con las tres cadenas helicoidales (De A. Rich.)

ral realizados con difracción de rayos X y microscopía electrónica, demostraron que las *fibrillas* que la componen poseen un período de repetición de 700 Å, que se reduce a 640 Å después de la desecación (fig. 6-9). Fue difícil establecer, al comienzo, cuál era la rela-

ción entre la molécula de tropocolágeno de 2800 Å y este período de repetición de 700 Å. Ello quedó aclarado cuando se reconstituyó el colágeno en presencia de algunas glucoproteínas o de ATP y se formaron otros dos tipos de fibras (fig. 8-3). Una estaba com-

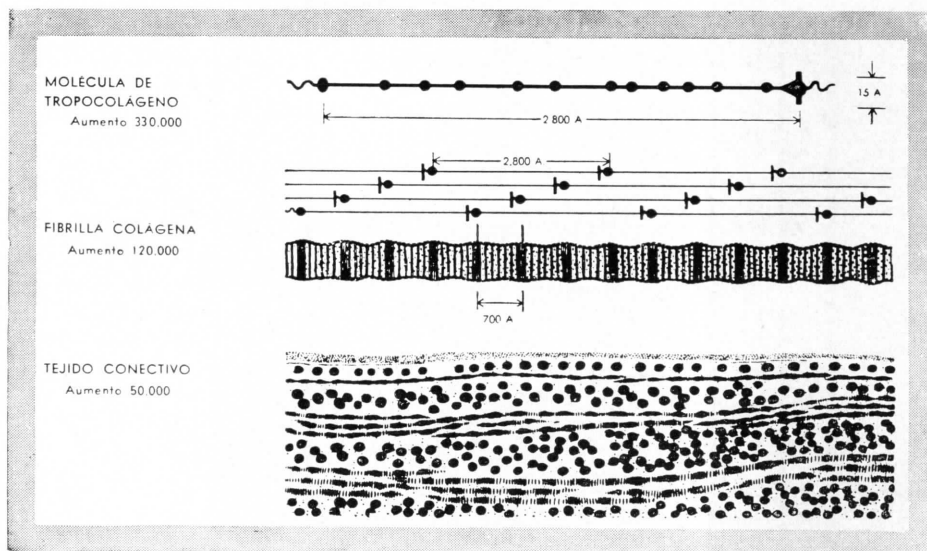


FIG. 8-2. Representación esquemática de la organización del colágeno, con diversos aumentos. Arriba: Molécula de tropocolágeno con la estructura provista de "cabeza y cola". En el medio: Fibrilla de colágeno con el período de 700 Å y su explicación molecular. Abajo: Organización de la fibrilla de colágeno en un tejido conectivo denso. (Cortesía de J. Gross.)

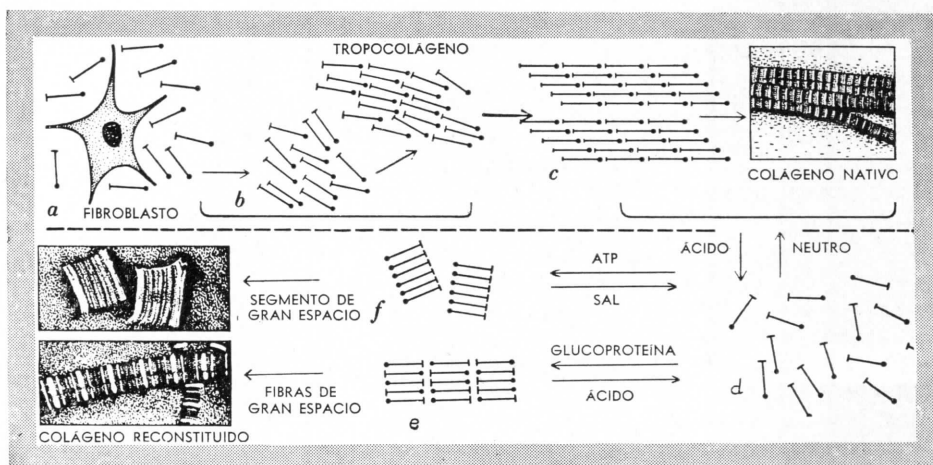


FIG. 8-3. Esquema de la formación y reconstitución del colágeno. Un fibroblasto (a), fabrica moléculas de tropocolágeno (b), que forma colágeno nativo (c). Las fibrillas de colágeno se solubilizan en ácido (d) y el tropocolágeno resultante, en presencia de glucoproteínas, produce fibras con espacios largos (e) y, con el agregado de ATP, colágeno en segmentos de espacio largo (f). Los espacios largos de 2800 Å resultan de la agregación lateral de las moléculas de tropocolágeno sin superposición. El espacio de 700 Å de colágeno nativo se debe a la superposición de la molécula de tropocolágeno. (Cortesía de J. Gross.)

puesta por largas fibrillas con períodos de 2800 Å, y la otra contenía segmentos cortos con períodos similares, pero no evidenciaba ninguna polimerización. La explicación más probable de estos descubrimientos se halla ilustrada en las figuras 8-2 y 8-3. De acuerdo con esta última, las fibrillas de colágeno nativas —con períodos de 700 Å— resultan de la asociación lateral de moléculas de tropocolágeno, las que se superponen a intervalos de un cuarto de su longitud. Se presume que en este caso las moléculas están asociadas longitudinalmente cabeza con cola (fig. 8-2). En las fibras colágenas con espacios largos que provienen de la interacción con glucoproteínas, no existiría superposición lateral y las moléculas de tropocolágeno estarían agregadas una al lado de la otra y unidas al azar en dirección lineal. En los segmentos resultantes de la interacción con ATP, se cree que las moléculas de tropocolágeno no se superponen lateralmente, pero al mismo tiempo, debido a que todas ellas están en fase, no pueden unirse en sentido longitudinal (fig. 8-3).⁸

Este mecanismo de interacción macromolecular del colágeno es de gran interés biológico, puesto que probablemente actúe también en otros sistemas proteicos. De hecho, se observaron resultados semejantes en el estudio de algunas proteínas del músculo, como la paramiosina y la tropomiosina.⁹

Coagulación sanguínea

Otro ejemplo ilustrativo es el importante proceso de la *coagulación sanguínea*. La molécula de fibrinógeno es asimétrica y tiene un peso molecular de 340,000 (tabla 8-1).

	Contenido α hélix %	Peso molecular	Modelo	Largo en Å
Tropomiosina	> 90	53,000		400
Meromiosina liviana	> 90	135,000		800
Paramiosina	> 90	200,000		1,400
Miosina	65	530,000		1,400
Meromiosina pesada	50	350,000		400
Fibrinógeno	30	340,000		460
PROTEÍNAS GLOBULARES				
Mioglobina	70	17,000		30 Å
Seroalbúmina	45	68,000		50 Å

Con el microscopio electrónico aparece compuesta de tres esferas, de alrededor de 65 Å, conectadas por un filamento delgado de 15 Å. La longitud total varía entre 230 y 460 Å, según el pH.¹⁰

Por la acción de la trombina, que separa un pequeño péptido del fibrinógeno, éste es activado y comienza a interactuar con otros monómeros. La asociación por los extremos produce largas fibrillas de fibrina,¹¹ pero también existe una interacción lateral que ocasiona la unión de las fibrillas entre sí a modo de un verdadero enrejado. A medida que la coagulación progresa, por acción de las plaquetas sanguíneas,¹² tiene lugar la retracción y expulsión de las proteínas, con la constitución final del coágulo.

Fuerzas fisicoquímicas

La naturaleza de las fuerzas que intervienen en estas diferentes interacciones macromoleculares varía considerablemente. En el caso de las fibras de colágeno, el hecho de que sean solubles en ácidos orgánicos débiles indica que probablemente estén implicadas las uniones salinas y los puentes de hidrógeno. En el caso de la coagulación sanguínea, el proceso de unión de las moléculas es más complejo, puesto que, como se indicó más arriba, la interacción implica una acción enzimática.

En otras proteínas, como las que forman los diferentes tipos de queratina, toman parte uniones más fuertes como las disulfuro —S—S—. En el interior de la célula pueden producirse agregados reversibles de proteínas corpusculares. Esta transformación globular-fibrosa ocurre en algunos procesos que comprenden desplazamientos de regiones de la matriz celular, como el movimiento ameboide, la ciclosis o la formación del aparato mitótico. En el capítulo 22 se verá la relación existente entre estos mecanismos y la formación de microtúbulos y filamentos.

La organización macromolecular del glucógeno en partículas

Un interesante caso de interacción molecular se observa en los depósitos de glucógeno encontrados en las células hepáticas y musculares y en muchos otros tejidos. En el capítulo 4 se mencionó la estructura ramificada de los polisacáridos, amilopectina y glucógeno, por medio de las uniones 1,6-α-glucosídicas. Con el microscopio electrónico fue posible observar que las partículas de glucógeno poseen tres niveles de organización, cada uno de ellos con una morfología y tamaño especiales.^{13, 14} Las unidades más grandes —las partículas α— son esferoidales y miden entre 500 y 2000 Å, con un promedio de 1500 Å. Estas partículas poseen un aspecto mo-

ricular, lo cual indica que están formadas por unidades más pequeñas —las partículas β — que son redondas o poliédricas y tienen un diámetro de 300 Å (fig. 8-4). Por fin, se comprobó que en el interior de las partículas β existe una estructura más fina —las partículas γ —, constituida por bastones de 30×200 Å. Las diferentes unidades del glucógeno pudieron ser disociadas por la acción de ácidos (fig. 8-4).

La síntesis del glucógeno se verifica en dos pasos sucesivos, que pueden ser seguidos con el microscopio electrónico. En presencia de partículas β , glucosa-1-fosfato, adenosinmonofosfato y la enzima *fosforilasa*, se forman largas estructuras filamentosas de tipo amilosa (no ramificadas).

La adición de la enzima *ramificante* suscita un cambio morfológico consistente en la ramificación de los filamentos. Cuando se utilizan concentraciones adecuadas de las dos enzimas se produce el glucógeno tipo¹⁵.

Los ribosomas, que constituyen estructuras macromoleculares importantes de la célula, serán estudiados en el capítulo 8.

Pueden observarse moléculas de ferritina con sus cuatro subunidades típicas en el interior de muchas células, particularmente en aquellas que participan en el metabolismo de pigmentos que poseen hierro. Asimismo, se hallan formaciones cristalinas de proteínas en diferentes células y en orgánoides celulares.

ESTRUCTURAS MEMBRANOSAS ELEMENTALES

Se sabe que las membranas biológicas resultan de la interacción de lípidos y proteína, pero la disposición molecular de dichos componentes es difícil de determinar. En este campo el empleo de modelos y películas artificiales monomoleculares es de considerable interés.

Técnica de las monocapas

En el capítulo 4 se indicó la importancia estructural de ciertos lípidos. Los ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y ésteres del colesterol se pueden disponer en capas únicas de

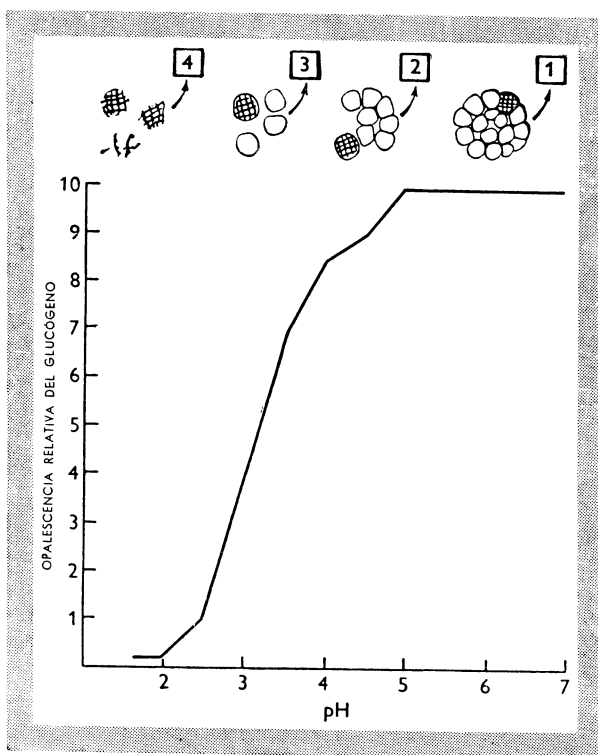


FIG. 8-4. Estructura de partículas de glucógeno. A diferentes pH existe una disociación progresiva de la partícula del glucógeno. (Véase el texto.) (De A. Drochmans¹⁴.)

espesor constante. La orientación de los lípidos dentro de la estructura depende de su constitución bipolar, con un grupo polar y una cadena de hidrocarburo no polar (figura 8-5, A). Estas propiedades de los lípidos se estudian produciendo películas sobre la superficie del agua.

La técnica de realizar *monocapas* o películas *monomoleculares* es de importancia biológica considerable. La denominada *balanza de tensión superficial*, realizada por Langmuir en 1917, perdura como el principal instrumento para el estudio de dichas películas. Consiste esencialmente en dispersar la sustancia que ha de investigarse sobre la superficie del agua contenida en un recipiente. Por medio de una barra o barrera se puede comprimir la película. La presión ejercida sobre ésta se mide por medio de una palanca muy sensible, suspendida y flotante.

Si un ácido graso como el esteárico (compuesto por 18 carbonos) se disuelve en un solvente volátil y es depositado sobre el agua, las moléculas se esparcirán hasta que lleguen a un equilibrio. Después de la evaporación del solvente, se forma una capa cuyo grosor es de una sola molécula. Como la molécula es bipolar, el grupo polar ($-\text{COOH}$) será atraído por la molécula de agua y la cadena no polar tenderá a permanecer vertical sobre la superficie. Al principio, debido al amplio espacio, algunas moléculas no se encuentran bien alineadas, pero al empujar la barra la superficie se reduce y las moléculas se com-

mir la película. La presión ejercida sobre ésta se mide por medio de una palanca muy sensible, suspendida y flotante.

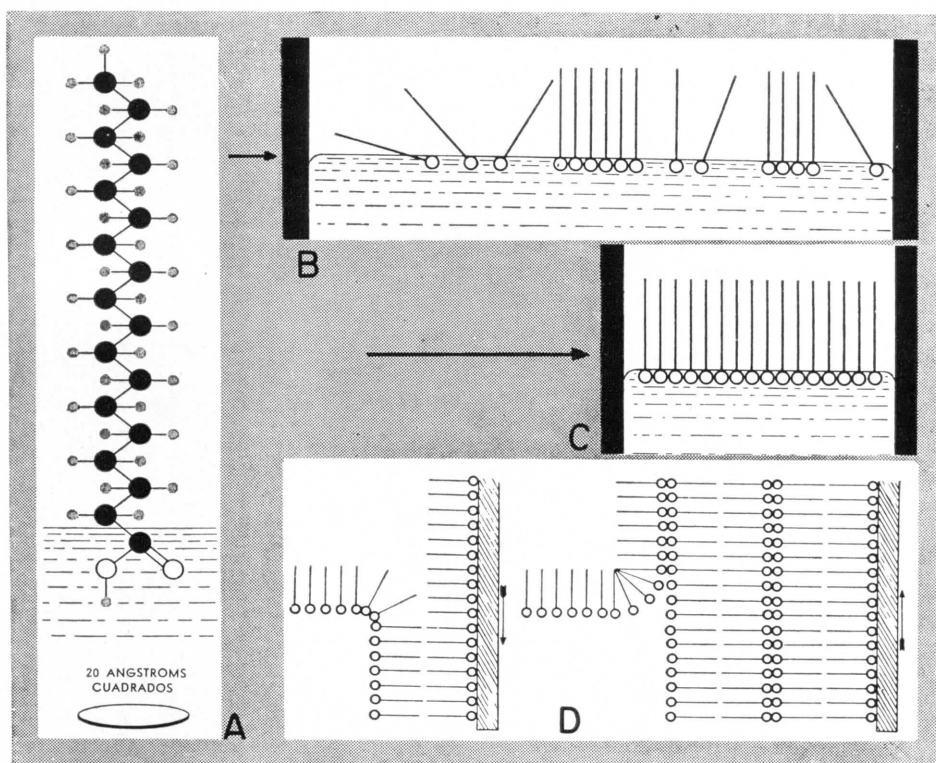


FIG. 8-5. Esquema que ilustra la técnica para realizar películas de capa única. A Molécula de ácido esteárico con los grupos polares hundidos en el agua. B Con baja compresión las moléculas están orientadas formando ángulos diferentes o agregados en grupos. C Con una compresión más alta las moléculas se hallan íntimamente agrupadas y se disponen en forma vertical. Los círculos representan a los grupos polares y las líneas enteras a las cadenas de hidratos de carbono no polares. D Método de construir películas moleculares en interfases aire-agua. Izquierda: El portaobjetos cubierto con una capa monomolecular de estearato de bario (véanse los grupos polares adheridos a la superficie del vidrio) es hundido en el agua, que tiene una película molecular en la interfase. La segunda capa monomolecular se adhiere a la primera por los extremos no polares. Derecha: Se han depositado sobre el portaobjetos, por sucesivos hundimientos en el agua, diversas capas bimoleculares de estearato de bario. (A, B, C, de H. R. Ries; D, cortesía de D. Waugh.)

primen hasta que forman una capa compacta (fig. 8-5, B y C). En estas condiciones, como consecuencia del movimiento horizontal y de la repulsión eléctrica, las moléculas ejercen una presión susceptible de ser medida con la balanza. Es fácil comprender que, conociendo el número de moléculas y la superficie total ocupada por la película durante la compresión máxima, se puede calcular el área promedio de cada molécula. Para el ácido esteárico es de alrededor de $20 \text{ \AA}^2$ (figura 8-5, A). Este método permite medir también el espesor de la monocapa, que depende del número de carbonos de la cadena ($25 \text{ \AA}$ para el ácido esteárico).

La capa monomolecular puede depositarse sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio, sumergiendo a éste en agua. Como evidencia la figura 8-5, D, por inmersiones sucesivas es posible construir capas bimoleculares o multimoleculares. Es interesante observar que los grupos polares se atraen entre sí y lo mismo hacen los grupos no polares, de manera que por medio de esta técnica se producen capas bimoleculares que imitan las membranas biológicas. Un procedimiento similar utilizóse en el pasado para medir el espesor de las membranas de los eritrocitos, comparándolos bajo luz reflejada con capas de estearato de diferente espesor. Este instrumento, denominado *leptoscopio*,¹⁶ se usa poco en la actualidad, ya que el microscopio electrónico suministra información más directa. Por experimentos similares se obtuvieron sistemas multilaminares que proporcionan difracciones de rayos X coherentes, a partir de las cuales puede medirse la distancia o períodos que existe entre las capas.

Sistemas hidrolipídicos

La asociación molecular de los lípidos en el agua depende de la temperatura y concentración de los componentes, y puede ser estudiada por medio de la difracción de rayos X.¹⁷ Si la cantidad de agua es escasa y la temperatura baja, las moléculas lipídicas cristalizan. En concentraciones intermedias, dichas moléculas se asocian formando micelas dispersas en agua, que pueden adoptar distintas formas.

Utilizando fosfolípidos, se reconocen dos fases líquido-cristalinas:

a) *Lamelar* (fig. 8-6, a), formada por capas alternadas de lípidos y agua. En este sistema, mientras el espesor del lípido se mantiene constante, el del agua puede variar desde 10 hasta más de $60 \text{ \AA}$, de acuerdo con la concentración.

b) *Hexagonal* (fig. 8-6, b), constituida por estructuras hexagonales bidimensionales; el interior de los cilindros contiene agua y éstos están sumergidos en una matriz lipídica.¹⁸

Figuras de mielina

El tipo lamelar de fase lípido-agua forma las llamadas figuras de mielina.

Si los fosfolípidos extraídos del cerebro y de otros tejidos se mezclan con agua, ésta penetra entre las interfases polares y da lugar a estructuras concéntricas semilíquidas de aspecto vermicular que crecen a partir de la fase lipídica. Dichas estructuras tienen una fuerte birrefringencia con su eje orientado radialmente. Las moléculas lipídicas se disponen en capas bimoleculares, unidas entre sí por las interfases no polares (fig. 8-7).

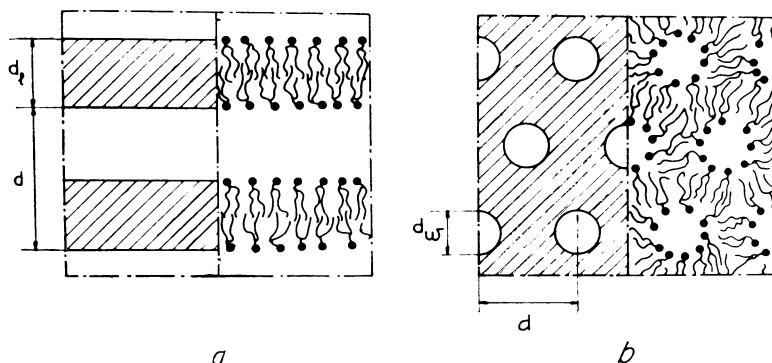


FIG. 8-6. Estructura de fases cristalinas líquidas en sistemas de fosfolípido-agua. a, configuración lamiforme; b, configuración hexagonal. (De V. Luzzati y F. Reiss-Husson.)

Las figuras mielínicas se estudian con difracción de rayos X; también pueden ser fijadas con tetróxido de osmio y observadas luego con el microscopio electrónico.¹⁹ Estos modelos son de considerable interés para la interpretación de las imágenes del microscopio electrónico. Las fotomicrografías revelan la alternancia de bandas paralelas claras y oscuras, que se repiten con un promedio de 40 Å. Puesto que —como se dijo en el capítulo 6— la imagen del microscopio electrónico depende de la dispersión de los átomos pesados presentes en la estructura, las bandas oscuras pueden atribuirse al depósito de osmio en esas estructuras multilaminadas. Aunque se sabe que el OsO_4 reacciona con las uniones dobles de los lípidos no saturados, otros datos favorecen el punto de vista de que la mayor parte del osmio es tomado por los grupos polares de los lípidos. Por tanto, las líneas densas generalmente se interpretan como correspondientes a las terminaciones polares de esas moléculas.¹⁹

En la disposición hexagonal mencionada (fig. 8-6, *b*), el microscopio electrónico pone de manifiesto un modelo similar, con puntos

oscuros en el lugar de la fase acuosa, indicando así que el osmio se une a los grupos polares.

Pueden hacerse modelos de estructuras membranosas más complejos incorporando cierta cantidad de proteína a la figura mielínica. En esas condiciones la imagen que se observa es análoga, pero posee bandas más anchas y densas que unen las estructuras lipídicas.

Como se ve en la figura 8-8, *B*, una doble capa de lípidos cubierta en ambos lados con proteína daría lugar a dos líneas paralelas densas de 25-50 Å, separadas por un espacio más claro de 20-25 Å, y esto es lo que realmente se observa con el microscopio electrónico (fig. 8-8 *A*).

Los sistemas lipoproteicos naturales poseen lípidos polares, como los ácidos grasos, fosfolípidos, cerebrósidos y gangliósidos, y lípidos no polares, como los glicéridos y los ésteres del colesterol. La asociación con proteínas parece efectuarse esencialmente con lípidos polares por medio de sus grupos polares (figura 8-8), formando uniones de hidrógeno o iónicas, o por interacción de sus termina-

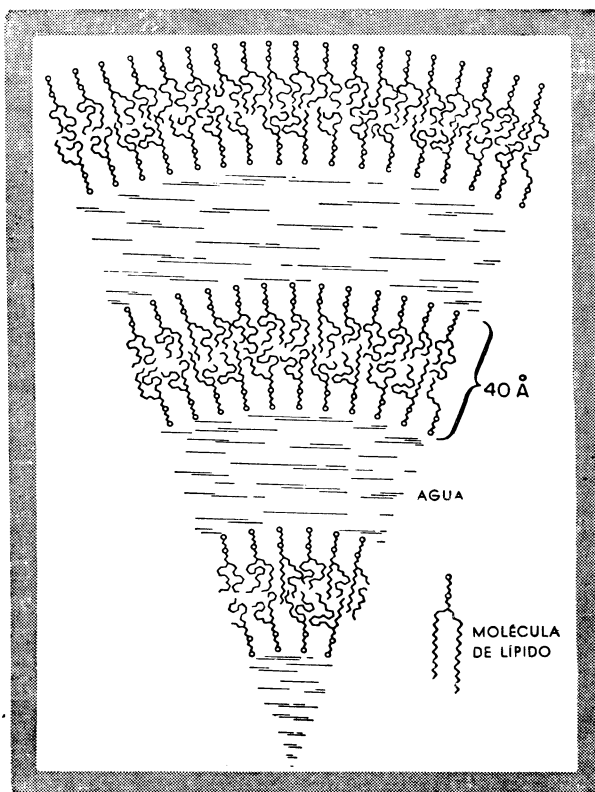


FIG. 8-7. Disposición molecular de los lípidos y el agua en una figura mielínica. Los grupos polares están representados por círculos. El grosor de las capas lipídicas es aproximadamente constante, mientras que las capas de agua cambian de espesor con el grado de hidratación del espécimen. (Cortesía de W. Stoeckenius.)

ciones no polares. Los lípidos no polares aparentemente están coordinados con las proteínas a través de asociaciones realizadas por medio de grupos polares.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Fernández-Morán, H.: (1959) Fine structure of biological lamellar systems. In: *Biophysical Science*. (Oncley, J. L. et al., eds.) John Wiley & Sons, New York.
- Frey-Wyssling, A.: (1953) *Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives*. Elsevier Co., New York.
- Gross, J.: (1961) Collagen. *Scient. Amer.*, 204(5): 120.
- Hodge, A. J.: (1959) Fibrous proteins of muscle. In: *Biophysical Science*, p. 409. (Oncley, J. L. et al., eds.) John Wiley & Sons, New York.
- Meyer, K. H. and Mark, H. (1950) *Makromolekularchemie*. Akademische. Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Schmitt, F. O.: (1959) Interaction properties of elongate protein macromolecules with particular reference to collagen (tropocollagen). In: *Biophysical Science*, p. 349. (Oncley, J. L. et al., eds.) John Wiley & Sons, New York.
- Sjöstrand, F. S.: (1959) Fine structure of cytoplasm: The organization of membranous layers. In: *Bio-*

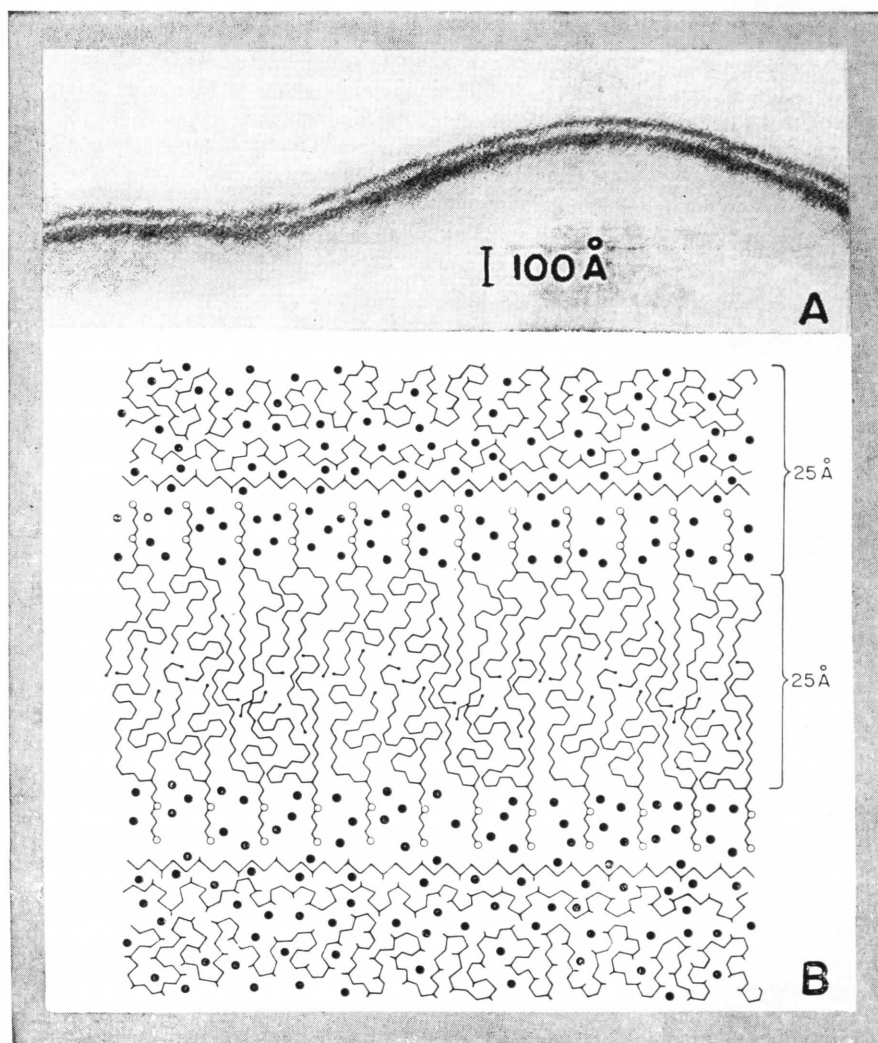


FIG. 8-8. A Fotomicrografía de la estructura laminar más fina encontrada en preparaciones lípido-proteína-agua. Es prácticamente idéntica a la estructura de la "unidad de membrana" observada en la membrana celular (fig. 9-4). 500,000 $\times$. B Esquema que muestra la probable disposición de las moléculas de lípidos de proteínas en tales membranas. Los puntos negros indican depósitos de OsO₄, que se hallarían principalmente en las interfases polares. (Cortesía de W. Stoekenius.)

physical Science, p. 301. (Oncley, J. L. et al., eds.) John Wiley & Sons, New York.
 Wolstenholme, G. E. W. and O'Connor, M. (eds.): (1966) *Principles of biomolecular organization*. Ciba Found. Symp. J. & A. Churchill, London.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Cohen, C.: (1966) *Ciba Found Symp*, p. 101. (G. E. W. Wolstenholme and O'Connor, M., eds.) J. & A. Churchill, London.
2. Doty, P. and Nishihara, T.: (see Linderstrom-Lang, K. In: *Lane medical lectures*, 1951. Stanford University Press, Stanford, Calif., 1952.)
3. Crick, F. H. C. and Rich, A.: (1955) *Nature*, 176:780.
4. Crick, F. H. C. and Rich, A.: (1957) In: *Recent advances in gelatine and glue research*, p. 20. Pergamon Press, London.
5. Schmitt, F. O., Gross, J. and Highberger, J. H.: (1955) *Symp. Soc. exp. Biol.*, 9:148.
6. Schmitt, F. O.: (1959) Interaction properties of elongate protein macromolecules with particular reference to collagen. In: *Biophysical science*, p. 349. (Oncley, J. L. et al., eds.) John Wiley & Sons, New York.
7. Gross, J.: (1961) *Scient. Amer.*, 204:5, 120.
8. Hodge, A. J. and Schmitt, F. O.: (1958) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 44:418.
9. Hodge, A. J.: (1959) Fibrous protein of muscle. In: *Biophysical Science*, p. 409. (Oncley, J. L. et al., eds.) John Wiley & Sons, New York.
10. Hall, C. E.: (1963) *Lab. Invest.*, 12:998.
11. Porter, K. R. and Hawn, C. V. A.: (1949) *J. exp. Med.*, 90:225.
12. De Robertis, E., Paseyro, P. and Reissig, M.: (1953) *Blood J. Hemat.*, 8:7.
13. Drochmans, P.: (1962) *J. Ultrastruct. Res.*, 6:141.
14. Drochmans, P.: (1963) In: Methods of separation of subcellular structural components. *Biochem. Soc. Symp.*, 23:127.
15. Drochmans, P.: (1968) *Excerpta med. Int. Congr.*, Series 166: p. 49.
16. Waugh, D. F. and Schmitt, F. O.: (1940) *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 8:233.
17. Luzzatti, V., Reiss-Husson, F. and Saludjian, P.: (1966) *Ciba Found Symp.*, p. 69. (G. E. W. Wolstenholme and O'Connor, M., eds.) J. & A. Churchill, London.
18. Luzzatti V. and Husson, F.: (1962) *J. Cell Biol.*, 12:207.
19. Stoekenius, W.: (1962) In: The Interpretation of ultrastructure. (Harris, R. J. C., ed.) *Symp. Internat. Soc. Cell Biol.*, vol. 1, p. 349.

9

La membrana celular

Se ha mencionado con anterioridad en este libro que la célula constituye una unidad cuyo medio interno es diferente del que la rodea. Por ejemplo, el contenido iónico de las células animales puede ser muy distinto del de la sangre circulante. Esta diferencia se mantiene durante toda la vida de la célula, por un continuo control de la entrada y salida de moléculas y iones, que se ejerce a través de una delgada barrera denominada *membrana plasmática*. Con el nombre de *permeabilidad* se designa a la propiedad que tiene la membrana plasmática de regular los intercambios entre la célula y el medio. Este proceso será estudiado en el capítulo 21.

La membrana plasmática es tan fina que no puede ser observada con el microscopio óptico, pero en algunos casos está cubierta de capas protectoras más gruesas que entran en los límites de la visibilidad microscópica. Tal es el caso de la mayoría de las células vegetales, que poseen una gruesa pared celular cubriendo y protegiendo a la verdadera membrana plasmática (fig. 2-4). Las células animales pueden hallarse rodeadas asimismo de sustancias cementantes constituyendo paredes celulares visibles. Estas capas de protección, denominadas también cubiertas externas, no desempeñan generalmente un papel fundamental en la permeabilidad, aunque suelen tener otras funciones importantes.

La membrana plasmática de la célula viviente se pone de manifiesto en forma indirecta, por medio de experimentos de microcirugía. Colocando en el medio colorantes a los cuales las células vivas no son permeables, éstas no se tiñen. En cambio, si se inyecta el colorante, queda retenido dentro de los límites de la membrana celular. La punción con microaguja determina una solución de continui-

dad en la membrana plasmática que puede repararse dentro de ciertos límites. Con lesiones más extensas, especialmente en ausencia de iones de Ca, el citoplasma es susceptible de salir al exterior, produciéndose la muerte de la célula.

En algunos casos especiales, la membrana celular se vuelve fácilmente visible. En el huevo de erizo de mar, después de la penetración de un espermatozoide se separa una membrana de la superficie, que impide la entrada de otros espermatozoides. Las observaciones con el microscopio electrónico demuestran que en este estado aparecen numerosos túbulos delgados en la región cortical del huevo, que contribuirían a la formación de una nueva membrana plasmática.¹

Aislamiento de la membrana plasmática

Diversos métodos son empleados para el aislamiento de membranas plasmáticas de una gran variedad de células, como los hepatocitos, células musculares estriadas, *Amoeba proteus*, huevos de erizo de mar o células del tumor ascítico de Ehrlich.² En la mayor parte de los casos, la pureza de las fracciones es controlada con microscopia electrónica, análisis enzimáticos, estudios de antígenos de superficie u otros procedimientos. Es fácil obtener membranas plasmáticas de eritrocitos sometidos a hemólisis. La extracción completa de la hemoglobina se obtiene a pH 8, aunque otros componentes son susceptibles de ser extraídos mediante este procedimiento.³ Sin embargo, aun en el caso de membranas aisladas de eritrocito —preparación que podría suponerse de la mayor pureza— los microtúbulos subyacentes serían contaminantes. Tales microtúbulos contienen una proteína semejante a la actina y análoga a la encontrada en otros tipos de microtúbulos⁴ (véase cap. 22). En las membranas plasmáticas de los hepatocitos, la contaminación cruzada con la fracción microsómica puede ser excluida, teniendo en cuenta la diferente composición enzimática de ambas fracciones.⁵

Composición química

La membrana plasmática de las células animales consiste fundamentalmente en proteínas y lípidos, con una pequeña cantidad de carbohidratos. En membranas de eritrocitos los lípidos varían entre el 20 y el 40 por ciento, mientras que las proteínas lo hacen entre el 80 y el 60 por ciento. Los hidratos de carbono, distribuidos entre los lípidos y las proteínas, llegan al 5 por ciento. Las membranas plasmáticas de hepatocitos están formadas por una estructura fosfolipoglucoproteica a la cual se hallan adheridas proteínas globulares. Los lípidos representan el 40 por ciento, las proteínas alrededor del 60 por ciento y los hidratos de carbono menos del 1 por ciento. La superficie externa de la membrana está cargada negativamente, debido a la presencia de ácido siálico y de grupos carboxilo y fosfato. Por este motivo, la membrana puede fijar proteínas cargadas positivamente. Las proteínas solubles son extraídas mediante lavado con soluciones salinas, obteniéndose así una fracción que contiene cuatro proteínas antigénicas, demostrables por métodos inmunológicos (véase cap. 7).

Lípidos. Los principales componentes lipídicos son los fosfolípidos (55 a 57 por ciento), de los cuales la lecitina está presente en un 15 a 22 por ciento. Hay alrededor de 75 a 90 moléculas de lípido por molécula proteica. Aunque se considera que la mielina del sistema nervioso central es una membrana plasmática de origen oligodendroglial, su composición lipídica difiere ciertamente de la de otras membranas aisladas del cerebro. En la tabla 9-1 se observa que las relaciones entre fosfolípidos, colesterol y galactolípidos varían considerablemente en la mielina, membranas de terminaciones nerviosas (membranas plasmáticas), vesículas sinápticas y mitocondrias del cerebro.⁶

TABLA 9-1. Proporciones molares de lípidos en algunas fracciones subcelulares de la corteza cerebral

	Fosfolípidos	Colesterol	Galactolípidos	Aminoácidos proteicos
Mielina	2.4	2.4	1	29
Membranas de terminaciones nerviosas	5.4	4.2	1	83
Vesículas sinápticas	10.8	6.7	1	142
Mitocondrias	14.4	4.7	1	415

Para una revisión sobre los lípidos en las membranas de eritrocitos, véase 2.

Hidratos de carbono. En los eritrocitos, la hexosa, hexosamina, fructosa y ácido siálico se encuentran principalmente unidos a proteínas. Lo mismo sucede con los carbohidratos de la membrana del hepatocito.

El ácido siálico se halla ligado a proteínas por medio de la N-acetilgalactosamina en la superficie externa de la membrana (fig. 9-3). Usando una reacción específica para glucoproteínas (reacción de Hale), puede hacérselo visible con el microscopio electrónico.⁷

Esta capa externa se encuentra regularmente espaciada y está ausente en las zonas llamadas uniones estrechas (véase más adelante). La reacción de Hale se vuelve negativa al someter la preparación a la acción de la neuraminidasa, enzima que separa el ácido siálico (ácido neuramínico) de la proteína. Sólo una pequeña parte del ácido siálico se halla en forma de gangliósidos (glucolípidos) en las membranas plasmáticas del hígado. Sin embargo, los *gangliósidos* son constituyentes significativos de la membrana neuronal y están probablemente relacionados con los procesos de transferencia iónica.^{8,9} Ha sido demostrada la localización preferente de los gangliósidos en las membranas de terminaciones nerviosas ricas en acetilcolinesterasa.¹⁰

Proteínas. Forman el grueso de la membrana plasmática y constituyen la fracción más difícil de caracterizar. En membranas de eritrocitos, después de extraer los iones, puede solubilizarse hasta el 90 por ciento de la proteína mediante la extracción con butanol-agua.^{11,12} Dicha proteína tiene un peso molecular relativamente alto, pero se desconoce su naturaleza química exacta. En la ultracentrífuga da picos de sedimentación de 5S y 10S, y un material de mayor coeficiente de sedimentación. Se ha propuesto el nombre de *tectinas* para las proteínas aisladas de membranas de eritrocitos que, como ya se mencionó, son semejantes por su composición en aminoácidos y otras propiedades a la actina muscular y a la proteína "tipo-actina" de los microtúbulos (véanse capítulos 22 y 23). Este grupo de proteínas estaría implicado en la organización de una gran variedad de estructuras celulares.¹³

Enzimas. Cerca de 30 enzimas han sido identificadas en membranas celulares. Las más constantes son: 5-nucleotidasa, Mg^{++} - ATPasa Na^+ - K^+ activada, fosfatasa alcalina, fosfomonoesterasa ácida y ribonucleasa. Las dos últimas también se presentan en los lisosomas (véase cap. 21). Algunas enzimas tienen una localización preferente, como por ejemplo la fosfatasa alcalina y la ATPasa, que son más abundantes en los capilares biliares, mientras que las disacaridasas se encuentran en las microvellosidades intestinales. Se ha sugerido que estas enzimas cuentan con localizaciones específicas y una disposición en mosaico. La disacaridasa forma unidades globulares de 50-60 Å que revisten la membrana de la microvellosidad (véase P. Emmelot, 1968). Las membranas plasmáticas del hígado poseen algunas enzimas en común con los microsomas (por ejemplo, la glucosa-6-fosfatasa y la $NADH_2$ citocromo-C-reductasa), pero en concentraciones muy inferiores. Carecen además de la cadena respiratoria y de actividad glucolítica. De todas las enzimas mencionadas, la Mg^{++} - ATPasa Na^+ - K^+ activada es una de las más importantes debido a su papel en el pasaje de iones a través de la membrana plasmática (véase cap. 21). Dicha enzima depende de la presencia de

algún lípido y es inactivada cuando se realiza una extracción lipídica total.

La figura 9-1 demuestra la localización citoquímica de la ATPasa en una célula basal de la piel de rana. Conviene destacar que la reacción es negativa en el borde basal y en los desmosomas.¹⁴

ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El conocimiento de la estructura molecular de las membranas plasmáticas proviene principalmente de la integración de datos obtenidos por: a) análisis químico; b) estudio de

las diferentes propiedades fisicoquímicas de células vivientes; c) análisis óptico de sistemas multimembranosos, con microscopia de polarización y difracción con rayos X (por ejemplo, vaina de mielina); d) observaciones con microscopia electrónica de alta resolución. En el capítulo precedente hemos mencionado también la importancia del estudio de películas monomoleculares y figuras de mielina.

Antes del aislamiento de las membranas celulares, las teorías respecto de su estructura molecular se basaban generalmente sobre una

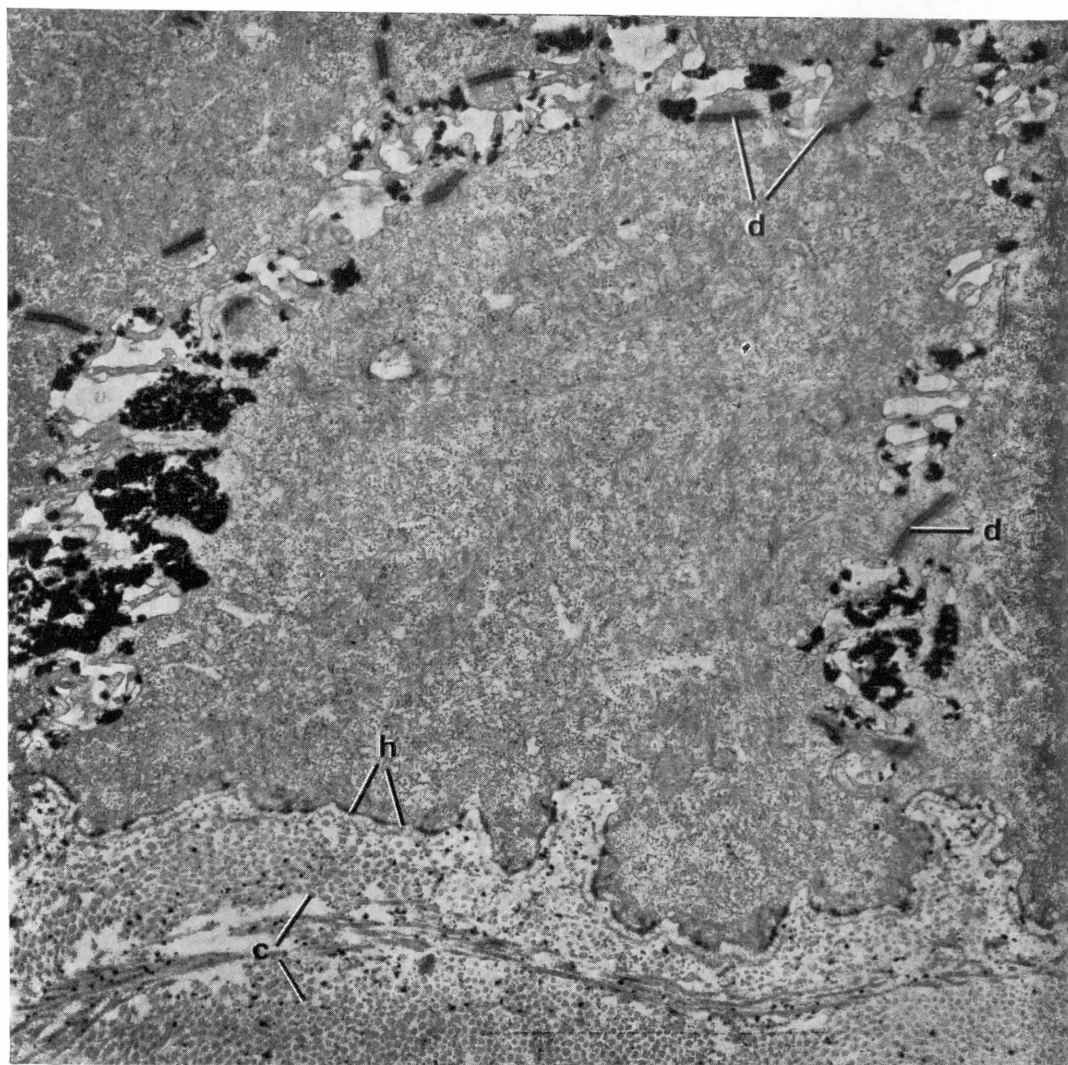


FIG. 9-1. Fotomicrografía electrónica de epidermis de piel de rana donde se ve la localización de la ATPasa en la membrana plasmática. Los depósitos densos de la reacción se disponen en los espacios intercelulares. C, colágeno; d, desmosomas; h, hemidesmosomas, 14,000 X. (Cortesía de M. G. Farquard y G. E. Palade.)

información indirecta. El hecho de que sustancias solubles en lípidos penetren más fácilmente, condujo a Overton en 1902 al concepto de que la membrana plasmática podía estar constituida por una fina capa de lípidos. En 1926, Gorter y Grendell encontraron que el contenido lipídico de los eritrocitos hemolizados era suficiente para formar una capa continua de 30-40 Å de espesor sobre la superficie entera y supusieron que la membrana plasmática estaba compuesta por una capa bimolecular de moléculas lipídicas.

Dicha teoría también se favoreció por medidas eléctricas que indicaban la presencia de una alta impedancia en la membrana plasmática. En el axón gigante del calamar aquella es del orden de los 1000 ohms por centímetro cuadrado. Esta propiedad resulta del hecho de que los iones penetran con dificultad a través de la capa lipídica y de ese modo la resistencia eléctrica es alta. Experimentos con agentes lipolíticos como los solventes lipídicos (benceno, tetracloruro de carbono), digitonina y lecitinasas que hidrolizan lecitina, abogan asimismo en favor de la constitución lipídica de la membrana celular.¹⁵

Una información más directa acerca del papel de los lípidos en las membranas se obtuvo con la producción de *membranas artificiales* que separan dos cámaras líquidas. Estas membranas demuestran una resistencia y una capacitancia muy similares a las de la membrana plasmática.^{16, 17}

Son también múltiples las pruebas de la presencia de proteínas en la membrana celular. Por ejemplo, la elasticidad y la fuerza mecánica al estiramiento y la compresión podrían deberse a proteínas fibrosas.¹⁸

Mientras que a nivel de una interfase agua-aceite existe una tensión de alrededor de 10 a 15 dinas/cm la tensión superficial en las células es casi nula. Por medio de fuerzas centrífugas sobre huevos de erizo de mar, hasta el punto en que la célula elongada se rompe en dos mitades, se calculó una tensión de 0.2 dinas/cm. Se han encontrado valores de 0.1 en eritrocitos y de 0.45 en hongos ameboides. Una tensión tan baja se explica generalmente por la presencia de capas de proteínas junto con los componentes lipídicos. En realidad, cuando se agrega una cantidad muy pequeña de proteína a modelos de sistemas lípido-agua, la tensión superficial desciende proporcionalmente.

Sin embargo, en membranas lipídicas artificiales la tensión superficial puede llegar a

sólo 1 dina/cm. Si se inyectan células animales de una especie a otra, las células actúan como antígenos y se producen anticuerpos en el suero, que pueden producir la lisis de las membranas celulares. En este caso la acción es contra las proteínas e hidratos de carbono presentes en ellas.¹⁹

Modelos basados en bicapas lipídicas

Para explicar todos estos hechos Danielli propuso la teoría de que la membrana está constituida por una capa de *moléculas lipídicas con proteínas* adheridas a las interfases lípido-acuosas.²⁰

La figura 9-2, *a-f* pone de manifiesto distintos modelos de membrana, cuyas diferencias radican en la constitución proteica o en su penetración en la bicapa lipídica.²¹ No obstante la delicadeza de la membrana plas-

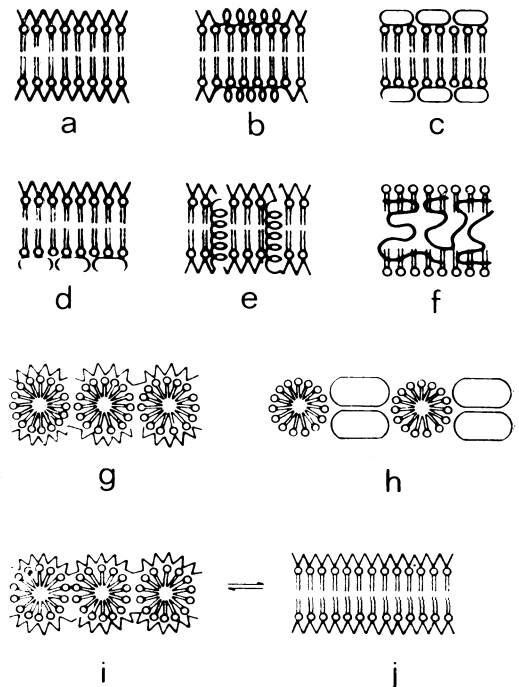


FIG. 9-2. Variedad de modelos moleculares propuestos para la membrana plasmática. *a-f*, modelos basados en la estructura bilaminar de los lípidos; *g-i*, modelos basados en una configuración globular; *a*, proteína tipo β y *b* tipo α -hélice; *c*, proteína globular; *d*, asimetría en la proteína; *e*, penetración parcial con canales o poros de proteína; *f*, proteína en el interior de las capas lipídicas; *g*, micelas lipídicas con proteína β ; *h*, ídem con proteínas globulares; *i* y *j*, transformación globular-bicapa. (Cortesía de A. L. Lehninger.)

mática, la elasticidad y relativa resistencia mecánica son atribuidas a la presencia de estas capas proteicas que, según se cree, mantienen su cohesión. Como se verá en párrafos siguientes, la microscopia electrónica confirma esta teoría, al menos en sus rasgos esenciales.

Otros modelos de membranas

Se han propuesto otros modelos de membrana constituidos por micelas lipídicas globulares, proteínas globulares, una combinación de ambas (fig. 9-2, *g-i*) o una transición bicapa-globular (fig. 9-2, *j*). Estos modelos globulares no explican satisfactoriamente la alta impedancia eléctrica.

El llamado *modelo agrandado de membrana*, que se observa en la figura 9-3, comprende la estructura lipoproteica junto con la cubierta celular situada en su superficie externa,²¹ sugiriéndose la existencia de glucoproteínas sobre las proteínas estructurales de la hoja externa de la membrana. Este complejo muestra terminaciones de ácido siálico cargadas negativamente, tanto en glucolípidos como en gangliósidos, que podrían fijar Ca^{++} y Na^+ . Revela, además, la asimetría de la membrana que, como se verá en el capítulo 21, está relacionada con procesos enzimáticos que tienen lugar a su través, como la entrada activa de K^+ y la salida de Na^+ .

Microscopia electrónica de la membrana plasmática

Las observaciones con el microscopio electrónico han aclarado algunos puntos sobre la ultraestructura de la membrana plasmática y pusieron de manifiesto las numerosas diferen-

ciaciones que puede tener aquella y el citoplasma celular subyacente, en los diferentes tipos celulares.

Las primeras observaciones en células cultivadas demostraron un límite definido en la periferia del citoplasma (fig. 10-6). Para estudiar la membrana plasmática se necesitan cortes extremadamente finos (~ 200 Å), de lo contrario el examen depende mucho de la orientación de la membrana con respecto al plano de corte. Se advierte que el espesor de la membrana parece ser menor cuando el corte es exactamente perpendicular a ella. El aumento de la resolución producido con esta técnica reveló que la superficie de todas las células poseía una membrana plasmática de 60 a 100 Å. Cuando dos células se ponen en íntimo contacto, las membranas de ambas aparecen como líneas densas, separadas por un espacio de 110 a 150 Å, que es sumamente uniforme y contiene un material de menor densidad electrónica (fig. 9-4, A). Este componente intercelular puede considerarse como un tipo de sustancia cementante. Cambiando la tonicidad de medio, es posible modificar dicho espacio, de manera que se expande o se reduce.²²

Como se explicará más adelante, las células adyacentes pueden estar totalmente adheridas en ciertos puntos de la membrana plasmática, constituyendo las denominadas uniones estrechas (fig. 9-4, B). Con el adelanto de las técnicas de preparación y la mayor resolución del microscopio se ha encontrado que la membrana plasmática de casi todos los tipos celulares consta de una estructura triple, con dos bandas densas de unos 20 Å y una capa central clara de aproximadamente 35 Å.²³

La denominación *unidad de membrana* fue aplicada a esta estructura que también existe

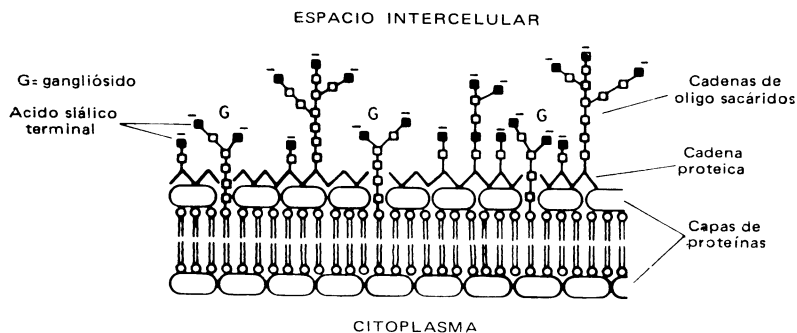


FIG. 9-3. Modelo de la membrana plasmática que incluye la cubierta superficial. (Cortesía de A. L. Lehninger.)

en la mayoría de las membranas intracelulares.²²

Especializaciones de la unidad de membrana

Mientras que se ha confirmado en general esta estructura básica triple, el adelanto de las técnicas permitió observar varios tipos de membranas que difieren en el espesor y en la asimetría de las capas.²⁴ Algunos deta-

lles finos se hicieron aparentes, como la presencia de pequeñas discontinuidades en las capas densas y, en especial, de puentes a través de la capa central más clara, lo cual puede sugerir la existencia de finos poros (figura 9-4, C). En cuanto al grosor, se ha visto que es mayor en la membrana plasmática (100 Å) que en las membranas intracelulares del retículo endoplásmico o del complejo de Golgi (50-70, Å).^{25, 26}

Esta disparidad en el espesor y en la com-

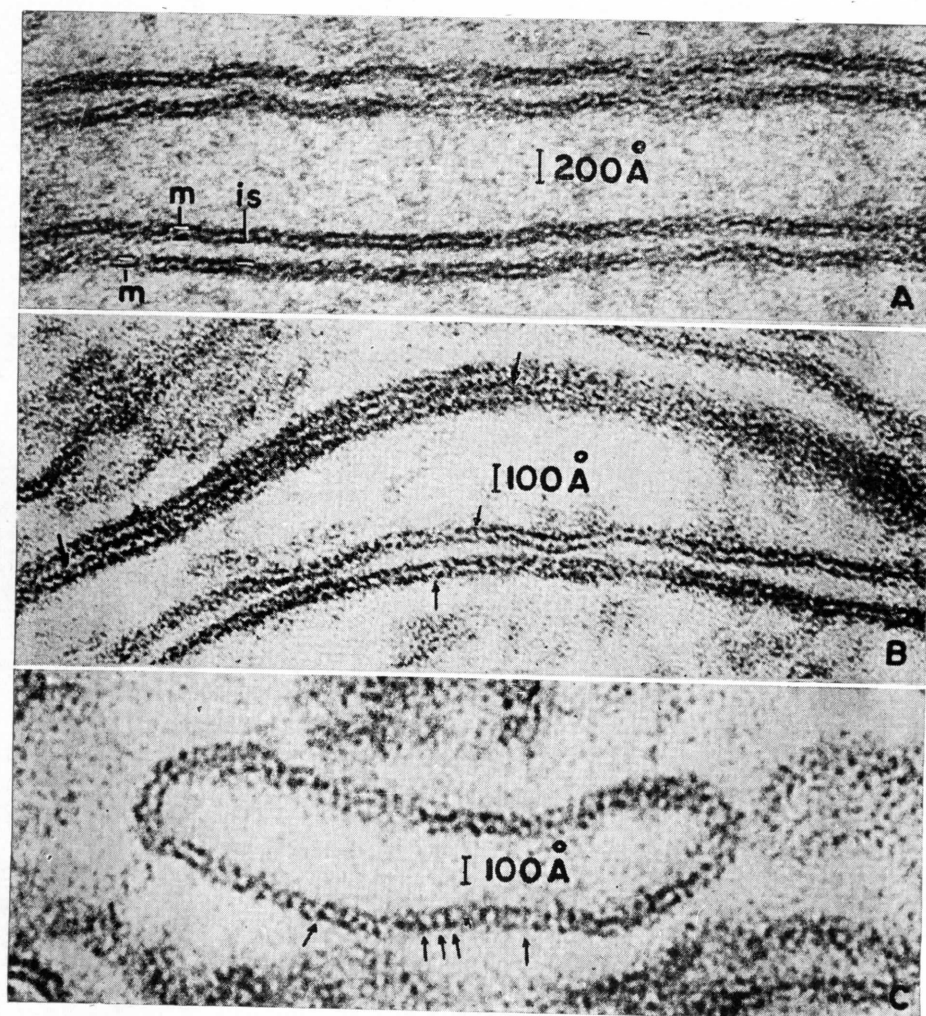


FIG. 9-4. A Fotomicrografía electrónica de membranas celulares de células intestinales. m, pone de manifiesto la estructura constituida por tres capas (unidad de membrana); is, espacio intercelular. 240,000 $\times$. B Membranas celulares, en hipotálamo de rata, mostrando la estructura de la unidad de membrana y, con flechas, algunos detalles finos que atraviesan la membrana. Las flechas superiores indican una región en la cual se encuentran adheridas las dos membranas celulares (uniones estrechas) y el espacio intercelular ha desaparecido. 360,000 $\times$. C Lo mismo que B, y además la presencia de puentes delgados (flechas) que atraviesan la unidad de membrana. 360,000 $\times$. (De E. De Robertis.)

posición química es susceptible de establecer diferencias precisas entre ambos tipos de membranas. La asimetría podría estar determinada por la presencia de material denso a los electrones, sea sobre la superficie interna o sobre la externa de la "unidad de membrana". Por ejemplo, la cubierta superficial de los mucopolisacáridos, denominada *glucocálix* (véase más adelante)²⁷, que cubre las microvelloidades, puede ser de 0.1 a 0.5 μ de espesor,²⁸ desprendiéndose de ellas en forma de material filamentosos. Otra diferenciación, en este caso de la superficie interna, la constituyen las invaginaciones de la membrana plasmática de 1000 a 1500 Å de diámetro, vinculadas con la pinocitosis de fluidos y la incorporación de proteínas. Reciben el nombre de *vesículas cubiertas* y poseen un material filamentosos adherido a la membrana plasmática.²⁹ Entre las células de los invertebrados existen contactos especiales, las *uniones tabicadas*, que permiten la comunicación intercelular y el acoplamiento eléctrico (véase cap. 20). Tales uniones tienen una estructura en panel de abeja, con paredes opacas de 80 Å y zonas centrales claras de 90 Å.³⁰ En las uniones estrechas, aisladas a partir de membranas plasmáticas del hígado, observóse también una subestructura hexagonal.¹³ Por último, en membranas del retículo endoplásmico se describieron unidades globulares de 50 Å²⁴ que, de acuerdo con algunas interpretaciones, se encontrarían transitoriamente en otras membranas.³¹ Para una revisión de las especializaciones de la unidad de membrana, véase.³²

Interpretación de la imagen obtenida con el microscopio electrónico

La imagen de la membrana proporcionada por el microscopio electrónico se interpretó en relación con estudios de modelos artificiales (fig. 8-8). Ya hemos mencionado que la zona central más clara corresponde a las cadenas hidrófobas de los lípidos. El grosor de dicha zona es menor que la longitud de dos moléculas de fosfolípidos extendidas, lo cual podría deberse a que éstas se hallan en un estado líquido bastante desordenado. En cambio, en las capas monomoleculares comprimidas ocupan un espacio mayor (fig. 8-8). Esta organización molecular permite el establecimiento de uniones, tanto hidrófobas como electrostáticas, entre lípidos y proteínas. Es interesante que, con la extrac-

ción de lípidos, una membrana previamente fijada en aldehídos no cambia la estructura de la unidad de membrana. Ello indica que es fundamentalmente la proteína la que produce la imagen observada con el microscopio electrónico.³³ Mientras que el modelo "capa lipídica bimolecular" y el de "unidad de membrana" todavía conservan su validez, en términos generales, actualmente parecen ser más interesantes aquellos que se basan en un esqueleto proteico.³⁴

Lo expresado hasta aquí indica que las membranas plasmáticas pueden presentar profundas variaciones de estructura y función en diferentes sitios. Esta complejidad resultará mucho más evidente al completar el estudio del capítulo 21, en el cual se consideran los problemas del transporte activo, moléculas transportadoras, sitios receptores y poros específicos.

Vaina de mielina

Una información adicional concerniente a la estructura molecular de la membrana proviene del estudio de algunos sistemas naturales de lipoproteínas multiestratificadas, como la vaina de mielina y los segmentos externos de conos y bastones.

La vaina de mielina es una membrana lipoproteica que rodea al axón o cilindroeje de la fibra nerviosa. En los nervios periféricos, se halla formada por células de Schwann, y en las fibras nerviosas centrales está constituida por la actividad de las células oligodendrogiales. Desde hace más de un siglo, se sabe que la vaina de mielina posee una fuerte birrefringencia, que indica un alto grado de organización en el nivel submicroscópico.

De acuerdo con estos estudios, la vaina de mielina tiene una estructura cristalina líquida, formada por capas bimoleculares de lípidos orientadas radialmente que alternan concéntricamente con capas de proteínas (fig. 9-5).

Estudios ulteriores con difracción de rayos X revelaron en nervios periféricos de anfibios espacios de 170 Å, y de 180 a 185 Å en los de mamíferos.³⁵ Dentro de este período, se estimó la proporción de moléculas lipídicas, proteicas y acuosas. La composición lipídica se encuentra aproximadamente en la relación de 2:2:1 para los fosfolípidos, colesterol y cerebrósidos.³⁶

En el modelo molecular de la figura 9-5 se postula la existencia de complejos de lecitina-colesterol (por ejemplo: glicerofosfátidos) y de esfingomieli-na-colesterol. El primer tipo coincide con el espesor de la capa lipídica (*L*); pero en el segundo, las moléculas de esfingomieli-na, más largas, deberían interdigitarse para llenar el mismo espacio.³⁷ El modelo también permite explicar la localización de las proteínas (*HP*) y del agua (*HL*), y está de acuerdo con que cada período de difracción de rayos X, de 180 Å, equivale a dos unidades de membrana. La configuración para la capa proteica corresponde al tipo plegado de la clásica cadena β (fig. 4-3). En este modelo, las dos unidades de membrana se hallan separadas por un espacio acuoso intraperiódico (*H*).

Los estudios con el microscopio electrónico han confirmado la estructura multimembranosa de la mielina. Con fijación en tetróxido de osmio, se encontraron períodos, que se repiten, de unos 100 a 120 Å, constituidos por una línea densa de 30 Å y una banda delgada y discontinua en la mitad del período (fig. 9-6).

Un método histoquímico basado en el uso del cromo aniónico, que preserva y se une preferentemente a los fosfátidos, permite analizar la organización química de la mielina en un nivel molecular.³⁸ Con esta técnica se descubren dos bandas densas que contienen los fosfolípidos dentro del período total (figura 9-6).

La función de la vaina de mielina, en la conducción nerviosa, parece ser la de material aislante para impedir la disipación de la energía en el medio circundante. Además de ello, es posible que actúe como un tipo de conductor resonante, en el que las ondas de energía que resuenan en las capas lipídicas existentes entre las membranas proteicas, pueden pasar con el máximo de velocidad y el mínimo de pérdida de energía (cap. 24).³⁹

Conos y bastones retinianos

Los conos y bastones retinianos son células sumamente diferenciadas, que tienen en el segmento más externo una estructura lipoproteica especialmente construida para la fotorrecepción. Los estudios con microscopía de polarización sugirieron una organización submicroscópica compuesta por capas trasversales de proteínas alternando con capas lipídicas orientadas a lo largo del eje del fotorreceptor. Este tipo de organización en capas fue realmente demostrado por microscopía electrónica en segmentos externos de bastones fragmentados⁴⁰ y en cortes finos de retina.⁴¹ Las observaciones indicaron que el bastón está constituido por una pila de discos (en número de varios centenares) superpuestos a lo largo del eje, los cuales son en realidad sacos aplanados⁴² provistos de dos mem-

branas de 30 a 40 Å de espesor, que rodean a un delgado espacio de 30 Å y se continúan por los bordes (fig. 9-7). El espacio entre los sacos del bastón es de 50 a 120 Å. Los segmentos externos de los conos, con pocas diferencias, poseen estructuras semejantes.⁴³

Los sacos de los bastones retinianos son muy sensibles a los cambios osmóticos. En soluciones hipotónicas se hinchan considerablemente y el espacio interno se hace mucho más grande (fig. 9-7, B).

El uso de bicromato para la demostración de los fosfátidos con el microscopio electrónico ha permitido la localización exacta de las capas lipídicas que alternan con proteínas en una organización molecular muy compacta.

En el capítulo 22 se estudiará la morfogénesis de los segmentos externos de conos y bastones.

La función de los fotorreceptores es transformar la energía luminosa en otro tipo de estímulo que pueda ser conducido por impulsos nerviosos. El proceso se basa en una serie de reacciones químicas, en las

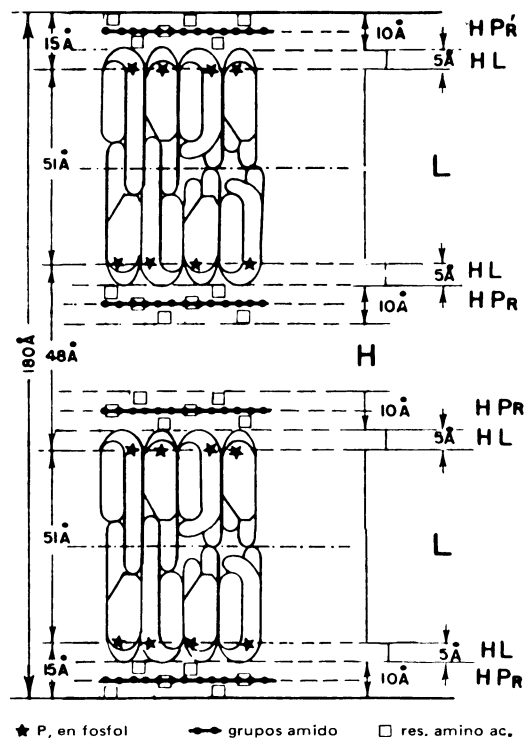


FIG. 9-5. Modelo molecular de la vaina de mielina. *HP_r*, capa de proteína; *HL*, capa de agua; *L*, capa lipídica bilaminar conteniendo complejos de lecitina-colesterol y esfingomieli-na-colesterol; *H*, agua en el espacio intraperiódico. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de F. A. Vandenhoevel.)

que intervienen los pigmentos visuales presentes en la proteína de las membranas de conos y bastones. La estructura multiestratificada posibilita la máxima absorción y utilización de la luz por los grupos cromóforos de los pigmentos visuales (retinenos).

La enorme sensibilidad de los fotorreceptores, que pueden reaccionar ante un solo fotón, se explica por el hecho de que las posibilidades de choque sobre una molécula sensible aumentan cientos o miles de veces, debido a la organización molecular de aquéllos. Así como sucede en el caso de la mielina y de los cloroplastos (véase cap. 12), estas capas pueden actuar como conductores resonantes que facilitan la interacción entre los pigmentos químicos acumulados en la membrana y la radiación incidente.

Diferenciaciones de la superficie celular

Ciertas porciones de la superficie celular están relacionadas con la absorción, secreción, transporte de líquidos y otros procesos fisiológicos. La introducción del microscopio electrónico facilitó el análisis y la interpretación de estas diferenciaciones, reconociéndose numerosas especializaciones de la superficie celular.^{44, 45} Se las clasifica topográficamente en: 1) especializaciones de la superficie celular; 2) especializaciones en la superficie de contacto entre células adyacentes, y 3) especializaciones de la base celular.

En el esquema de la figura 9-8, A se representa la visión tridimensional de una célula epitelial del túbulo contorneado proximal del riñón. En ella es dable observar los tres tipos de diferenciaciones. En la superficie

aparecen finas prolongaciones denominadas microvellosidades, que constituyen las unidades estructurales del ribete en cepillo de la microscopia óptica. En el borde izquierdo de la célula existe un contacto con la célula adyacente por medio de un punto de mayor adherencia, la *banda de cierre*. Finalmente, en la base celular se ven numerosos pliegues de la membrana plasmática que penetran profundamente en el citoplasma.

La chapa estriada del intestino es otro ejemplo de especialización de la superficie libre (fig. 9-9). Descrita hace más de un siglo como una capa homogénea con función de cutícula protectora, se reconoció más tarde en ella una estructura finamente estriada. Los estudios con microscopia electrónica, comenzados en 1950, revelaron su verdadera estructura.

Como se observa en la figura 9-8, B, está constituida por microvellosidades de 0.6 a 0.8 μ de largo, y solamente 1000 Å de diámetro, formadas por densas prolongaciones citoplásmicas a las que cubre la membrana plasmática. Esta posee la fina estructura triple anteriormente descrita. Las microvellosidades deben ser consideradas como un recurso para aumentar la superficie efectiva de absorción. Una sola célula es capaz de contener 3000 microvellosidades y en un milímetro cuadrado de intestino pueden existir alrededor de 200.000.000. Los finos espacios entre

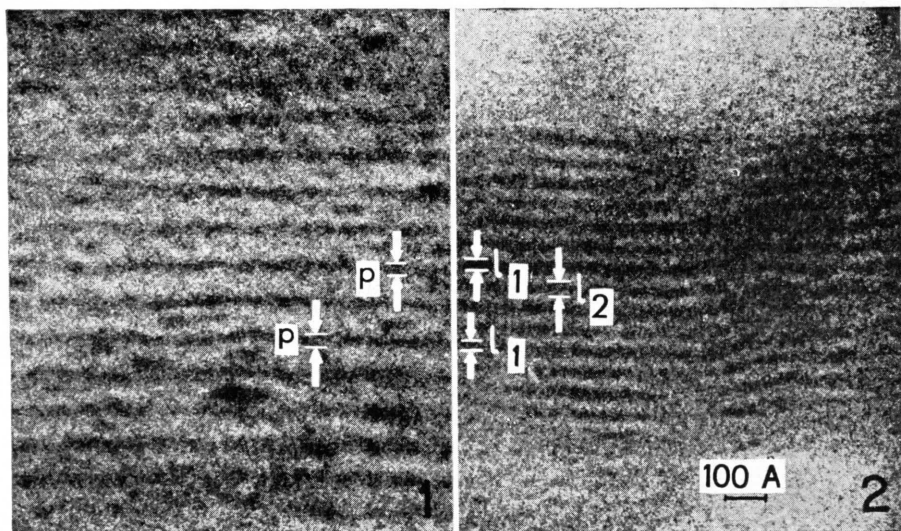


FIG. 9-6. Fotomicrografía electrónica de la vaina de mielina del nervio óptico de un anfibio. 1, fijación con tetróxido de osmio. 2, fijación con formol-bicromato para coloración electrónica de los fosfolípidos. 690,000 $\times$. (De Robertis y Lasansky, 1959³⁸.)

las microvellosidades forman una especie de filtro a través de los cuales diversas sustancias pasan durante la absorción. La figura 9-10 es una imagen estereoscópica de la superficie apical de una célula intestinal, en

la que se advierte la apretada disposición de las microvellosidades.

Otros tipos celulares poseen microvellosidades, aunque en menor número. Se han observado en las células mesoteliales, en el epitelio

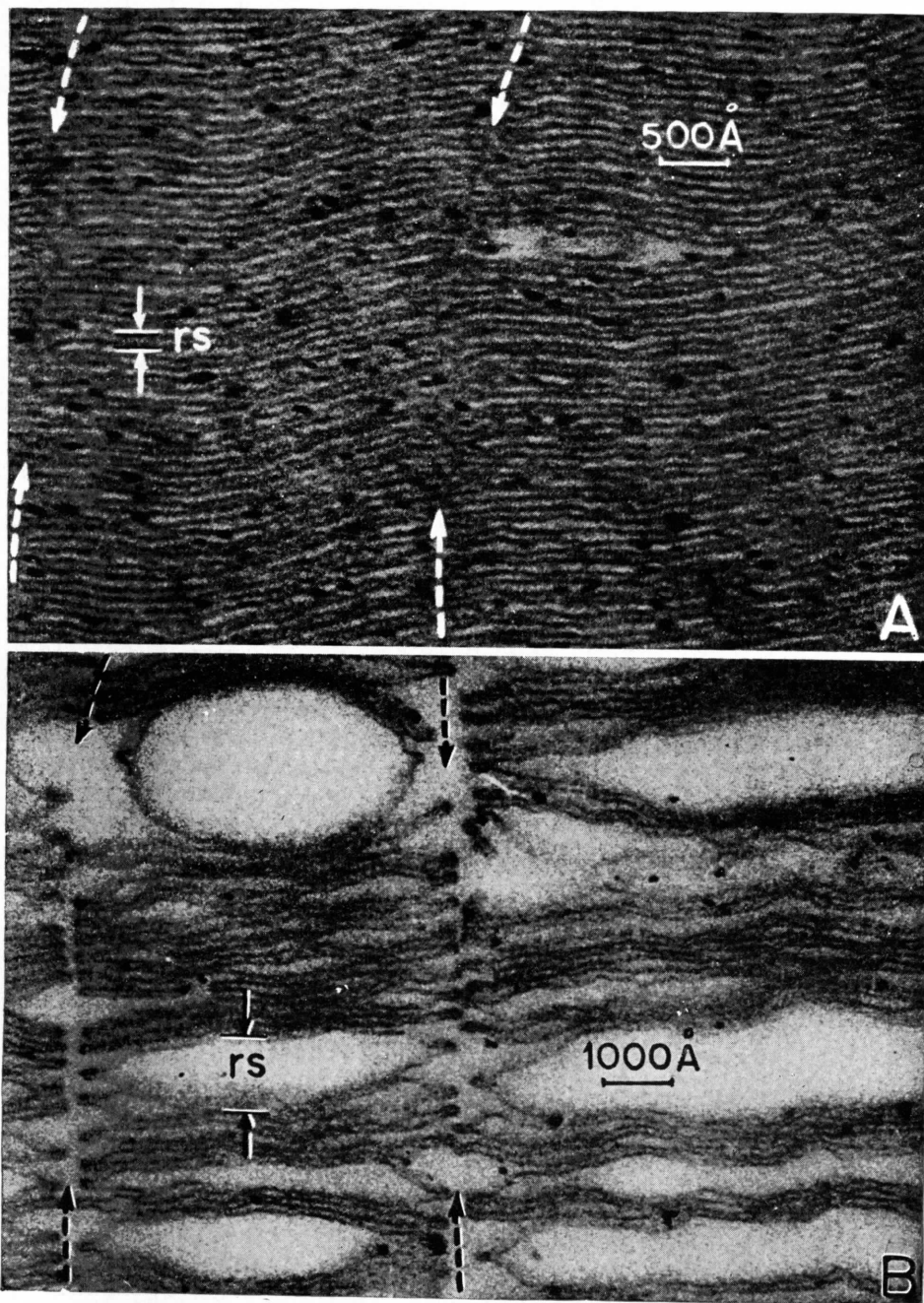


FIG. 9-7. Fotomicrografías electrónicas del segmento externo de los bastones retinianos del sapo. A, Fijación con tetróxido de osmio isotónico, que mantiene la organización regular de los sacos retinianos. 190,000 $\times$. B, Fijación con tetróxido de osmio hipotónico, que produce gran hinchazón de los sacos y separación de las membranas. (De Robertis y Lasansky ³⁸.)

de la vesícula biliar, en el útero y saco vitelino, en las células hepáticas, etcétera.

El *ribete en cepillo* del tubo renal es muy similar a la chapa estriada, pero de dimensiones mayores. Entre las microvellosidades se ve una sustancia amorfa que da la reacción de PAS para los polisacáridos. Entre las bases de las microvellosidades existen invagina-

ciones de la membrana celular que penetran en el citoplasma apical (fig. 9-8, A). Estas estructuras se consideran como vías por las cuales puede entrar líquido en cantidades considerables, por un proceso similar a la pinocitosis. En el capítulo 21 se estudiarán otras especializaciones de la superficie celular, como cilios y flagelos.

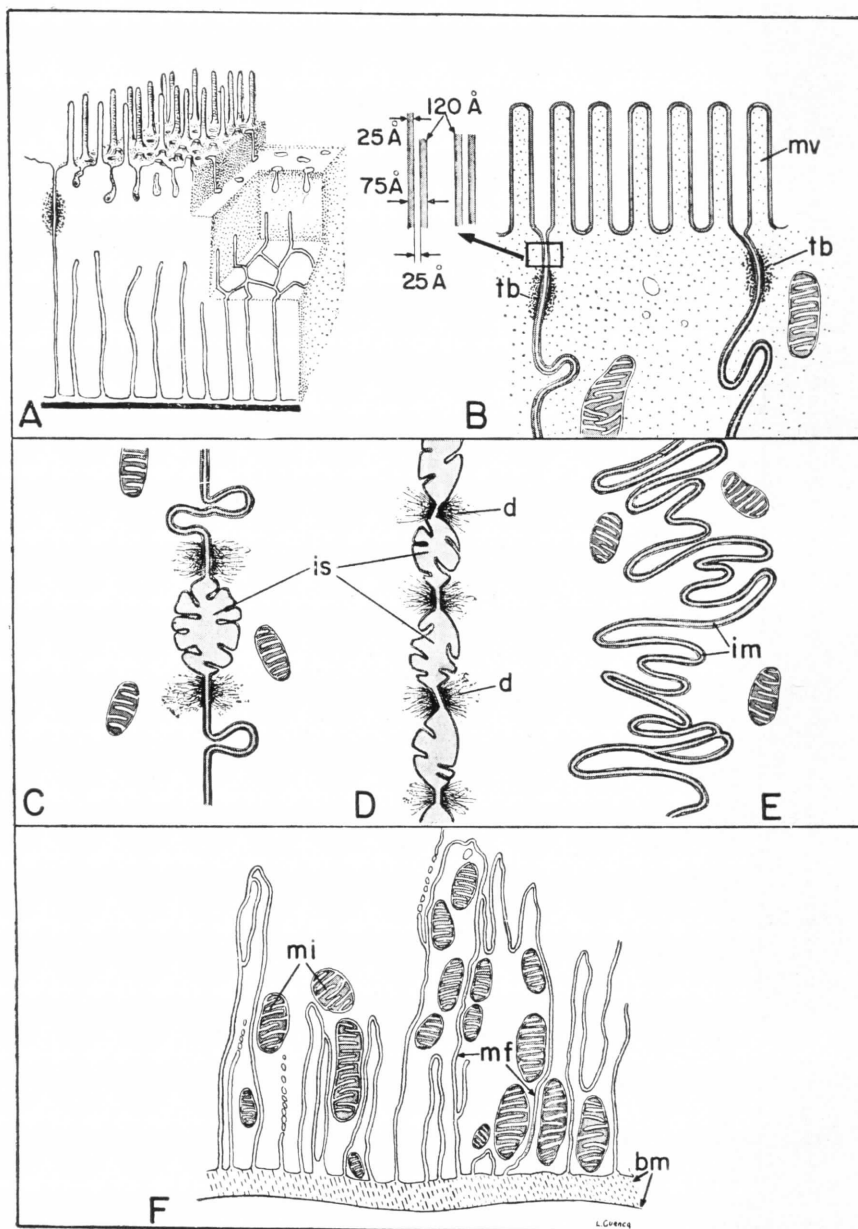


FIG. 9-8. Esquema general de algunas de las diferenciaciones de la membrana plasmática y de las relaciones intercelulares. *bm*, membrana basal; *d*, desmosoma; *im*, membranas interdigitadas; *is*, espacio intercelular; *mi*, mitocondria; *mf*, pliegues de la membrana; *mv*, microvellosidad; *tb*, barra terminal.

Desmosomas. El contacto entre las células adyacentes da lugar a diferentes tipos de especializaciones. En la figura 9-8, C, D, se representan los denominados *desmosomas*, que existen en diversas células epiteliales. Con el microscopio óptico aparecen como cuerpos oscuros situados en la parte media de lo que antes fue interpretado como un puente intercelular. Finas *tonofibrillas* convergen sobre el desmosoma. Anteriormente se pensó que éstas podrían pasar a su través, pero el microscopio electrónico demuestra que no hay una continuidad real entre las células (fig. 9-11).

Los desmosomas están formados por áreas circulares, de aproximadamente $0.5\ \mu$ de diámetro, provenientes de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes, separadas por una distancia de 300 a 500 Å. Por dentro de la membrana celular hay una densa placa intracelular hacia la cual convergen numerosos *tonofilamentos*. Éstos describen una asa de amplio arco y se dirigen nuevamente en dirección intracelular. Dentro del espacio extracelular del desmosoma se observa un material denso, formando en ocasiones una línea discontinua.

Mientras que los tonofilamentos proporcio-

nan el soporte mecánico intracelular, la adherencia celular a nivel desmosómico depende del material amorfo extracelular. Se observa con frecuencia que entre los desmosomas exis-



FIG. 9-9. Célula caliciforme del intestino de *Amblystoma*. Las otras células presentan una chapa estriada bien neta. Coloración con hematoxilina férrica.

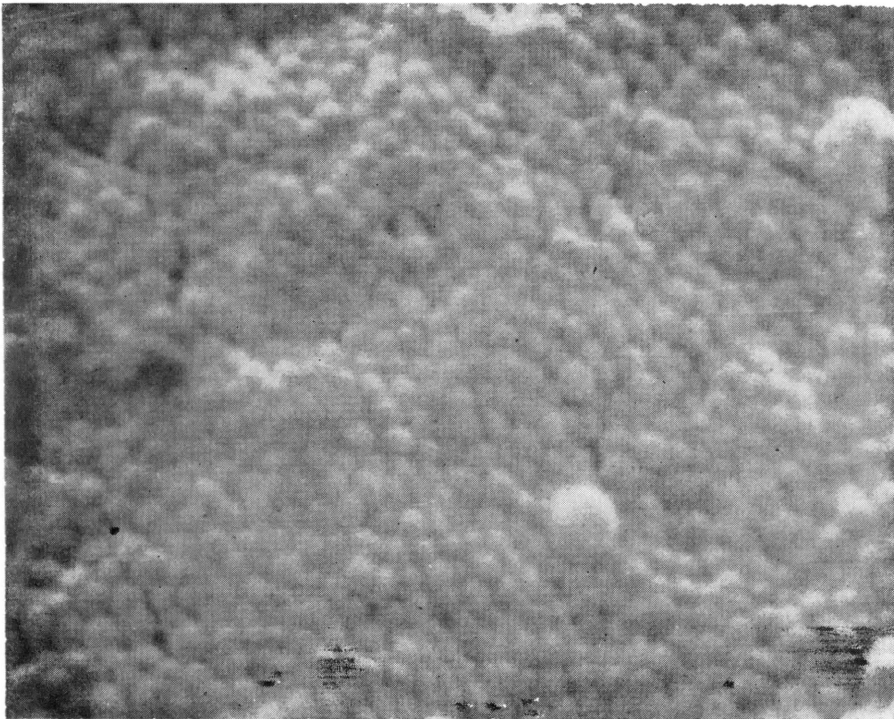


FIG. 9-10. Fotomicrografía electrónica, hecha con el microscopio estereoscópico, de la superficie de una célula intestinal. Se observan los extremos de las microvellosidades. 28,000 $\times$. (Cortesía de B. Ceccarelli, D. Marini y F. Clementi.)

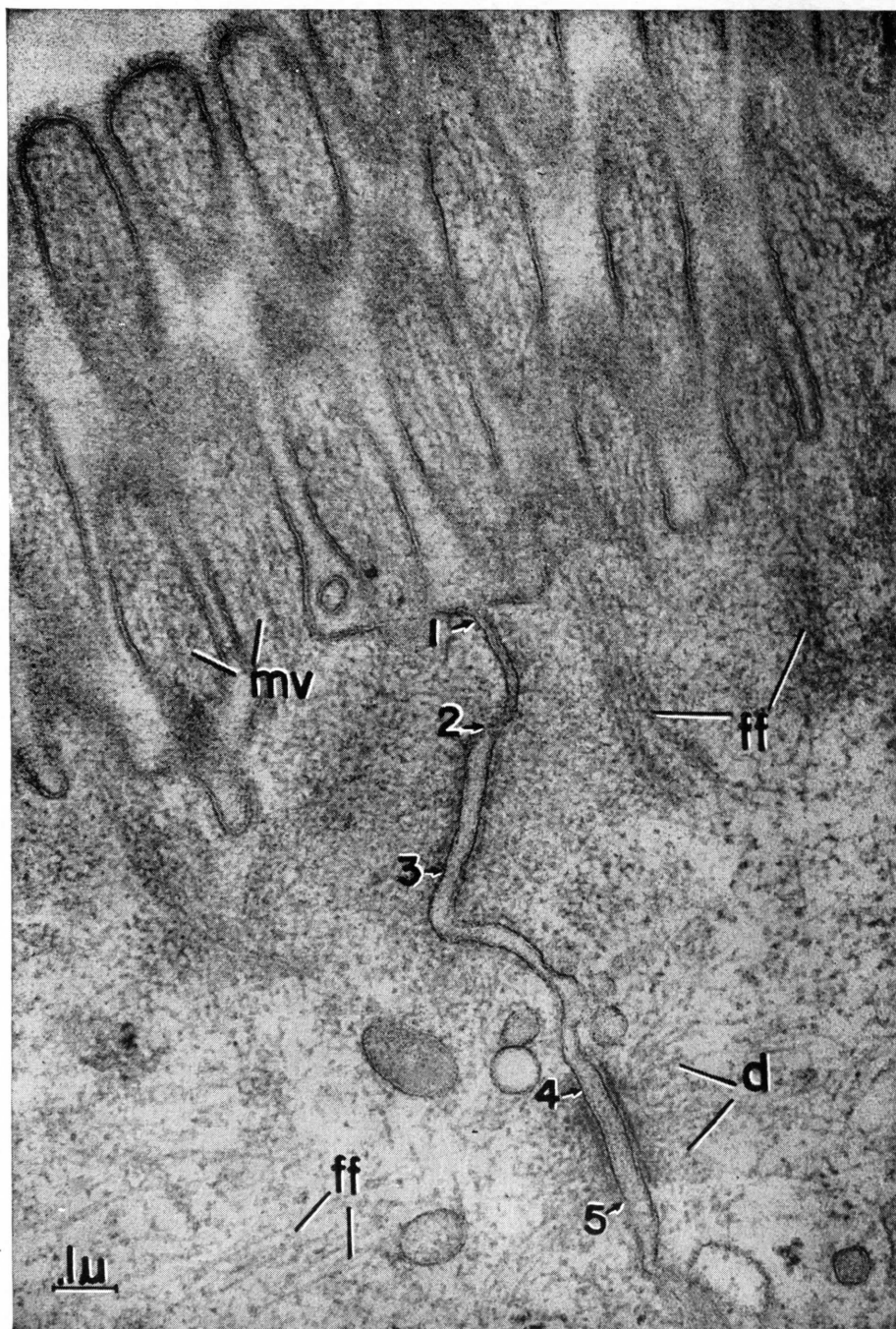


FIG. 9-11. Fotomicrografía electrónica que evidencia la región apical de contacto entre dos células intestinales. 1-3, unión estrecha; 2-3, unión intermedia; 4-5, desmosoma; ff, filamentos delgados en la matriz; mv, microvellosidades, 96,000 $\times$. (Cortesía de M. Farquhard y G. E. Palade.)

ten regiones donde el contacto es más laxo y así pueden hallarse verdaderos espacios intercelulares para la circulación libre de los líquidos (fig. 9-8, C y D). Se han evidenciado desmosomas en muchas células epiteliales y en cada caso ofrecen características particulares.

Sobre la superficie basal de algunas células epiteliales pueden encontrarse *hemidesmosomas*. Son similares a los desmosomas en su ultraestructura, pero representan sólo la mitad de ellos, estando constituidos en su mitad externa por fibrillas colágenas.⁴⁶

Los *desmosomas tabicados* se mencionaron



FIG. 9-12. Fotomicrografía electrónica de la región basal de una célula de Müller, de la retina del sapo, en la que se observan numerosas invaginaciones de la membrana basal celular (m). Se indican con flechas las aberturas de espacio intermembranoso en la base. b, membrana basal; c, fibrillas de colágeno; gl, glucógeno; mi, mitocondria. 60,000 X. (Cortesía de A. Lasansky.)

ya en relación con las especializaciones de la unidad de membrana. Son comunes entre células epiteliales de invertebrados.^{47, 48, 49} En este caso, las dos membranas plasmáticas, separadas por una distancia de 150-200 Å, se unen mediante tabiques transversales, paralelos entre sí, que están en continuidad directa con la hoja externa densa de la unidad de membrana. La importancia de los *desmosomas tabicados* respecto de las comunicaciones intercelulares y del acoplamiento eléctrico será considerada en el capítulo 21.

Las bandas de cierre se encuentran generalmente en el espacio entre las células cilíndricas, un poco por debajo de la superficie libre (figs. 9-8, B, y 9-11). Vistas con el microscopio electrónico son, hasta cierto punto, similares a los desmosomas. Aquéllas presentan un engrosamiento de la membrana y un material denso adyacente, pero por lo general faltan los filamentos.

Las bandas de cierre también se denominan *uniones intermedias* (*zónula adherens*; fig. 9-11, 2, 3).

Otras especializaciones de las superficies celulares adyacentes están constituidas por diversos tipos de interdigitaciones, uno de los cuales se ilustra en la figura 9-8, E. Cabe destacar que pueden ser aún más complejas por la presencia de desmosomas y bandas de cierre, que se suman a los ajustes de las superficies arrugadas.

En la base de ciertas células relacionadas con el rápido transporte del agua, existen numerosos pliegues de la membrana plasmática que penetran profundamente en la célula (figuras 9-8, F y 9-12). En una vista tridimensional, los pliegues forman tabiques que subdividen el citoplasma basal en compartimientos estrechos, que contienen grandes mitocondrias. Se cree que estas membranas poseen enzimas vinculadas con los mecanismos de transporte y que además están en íntima relación de vecindad con los sistemas dadores de energía, presentes en las mitocondrias (figura 9-8, F).

Uniones estrechas o herméticas. El contacto entre las células en diferentes tejidos de animales puede tener diferenciaciones especiales que actúan fisiológicamente como una barrera para la difusión. Como se muestra en la figura 9-11, entre las dos células existe una serie de tres zonas diferenciadas que comienzan a partir de la región apical con los siguientes componentes: la unión

estrecha (*tight junction*), la unión intermedia y el desmosoma.⁵⁰

La *unión estrecha* (fig. 9-11, 1, 2) o *hermética* se caracteriza por la fusión de las membranas celulares adyacentes, que conduce a la obliteración del espacio intercelular a lo largo de distancias variables. Se sitúa inmediatamente por debajo del borde apical, y en este punto la hoja más externa de la unidad de membrana se fusiona en una sola línea intermedia con la misma hoja de la célula adyacente. Se ha demostrado experimentalmente la importancia de las uniones herméticas en la permeabilidad epitelial. Este tipo de unión puede desempeñar también un papel significativo en la permeabilidad cerebral a nivel de la barrera hematoencefálica y de la barrera sináptica (fig. 9-13).

Uniones estrechas y acoplamiento eléctrico

En el capítulo 20 se tratará el problema del acoplamiento eléctrico y de las comunicaciones intercelulares, y en el capítulo 24 se mencionarán las sinapsis eléctricas.

Aquí nos limitaremos a considerar algunas de las posibles bases estructurales de estos fenómenos.

Además de los desmosomas tabicados y de las uniones estrechas, el acoplamiento eléctrico parece estar relacionado con un tipo de unión especial (*gap junction*) provista de un espacio diminuto entre las membranas. Estas uniones aparecen claramente en el miocardio, donde se aprecia, mediante el uso de sales de lantano (Revel y Karnowski, 1967), un espacio de aproximadamente 20 Å.

En cortes tangenciales se observa una disposición hexagonal, con unidades de 70-75 Å. Estos prismas hexagonales comprenden tanto el espacio intercelular como las hojas externas de ambas membranas. El material opaco a los electrones es capaz, en apariencia, de penetrar entre los hexágonos y también en el centro de estos prismas. Mediante la técnica de congelación-grabado (véase capítulo 7), la estructura hexagonal parece estar ubicada en la zona central de este tipo de unión (Benedetti, 1969).

CUBIERTAS EXTERNAS DE LA MEMBRANA CELULAR

Al comienzo de este capítulo se mencionó la presencia de cubiertas externas que rodean a ciertas membranas celulares. Son muy evi-

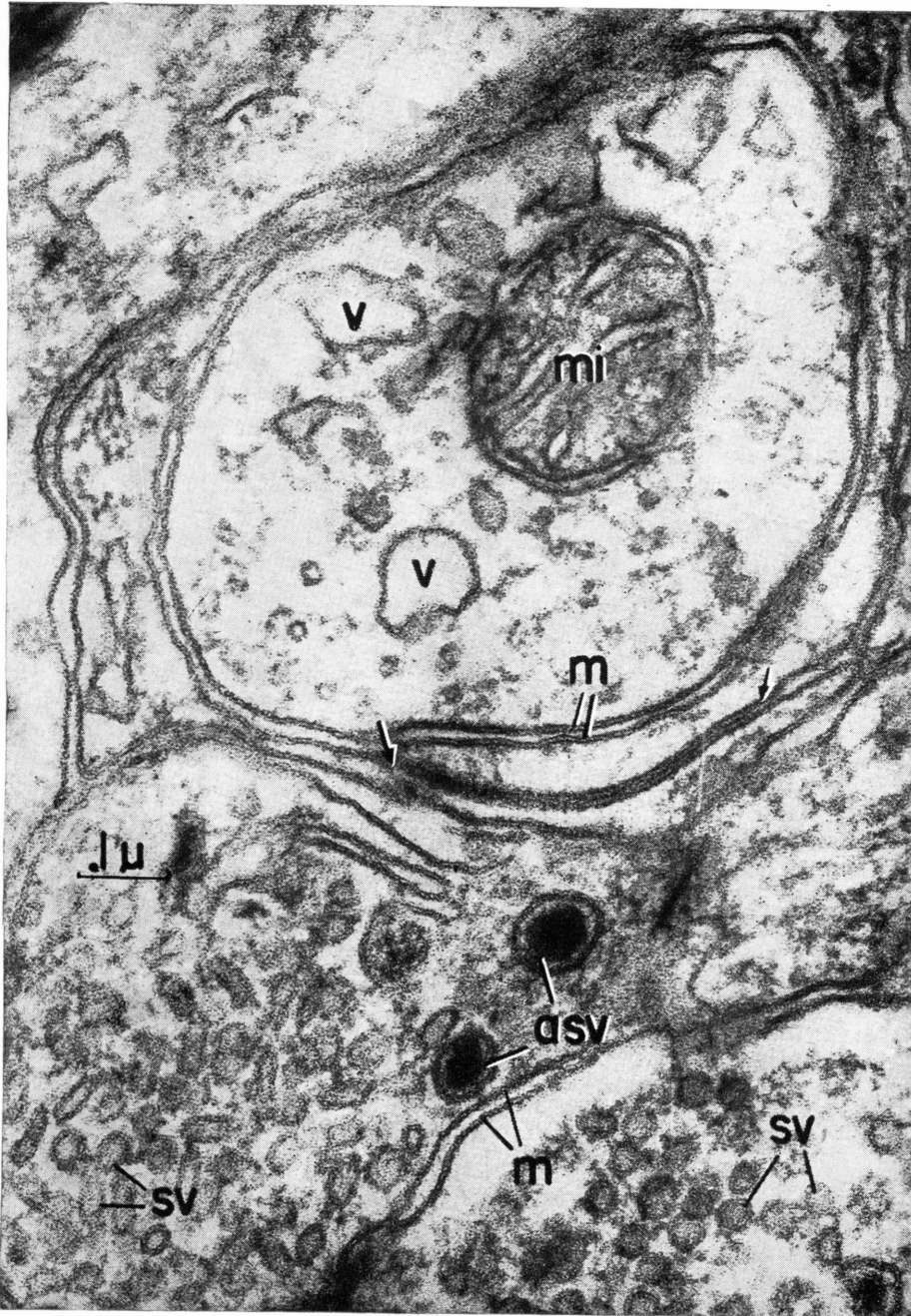


FIG. 9-13. Fotomicrografía electrónica de terminaciones sinápticas en el hipotálamo de la *rata*. *asv*, vesícula sináptica granular; *m*, membrana celular; *mi*, mitocondria; *sv*, vesícula sináptica; *v*, vacuola. Véase que en las membranas de todos estos componentes se aprecia la unidad de membrana con una organización compuesta por tres capas. Se indica, entre flechas, una unión estrecha rodeando a una terminación sináptica. 135,000 $\times$. (De E. De Robertis.)

dentes en huevos de animales marinos y de anfibios. El principal constituyente es una *mucina* de naturaleza glucoproteica. Las mucinas cubren y protegen asimismo la superficie de las células que revisten el tracto gastrointestinal. Los polisacáridos constituyen la *pectina* y la *celulosa* de las membranas de células vegetales y la *quitina* de los crustáceos.

En la base de la mayoría de las células epiteliales, en capilares y también en muchos espacios intercelulares, se encuentran glucoproteínas y polisacáridos del tipo del ácido hialurónico. Se ha creado la palabra *glucocálix*²⁷ para designar a la cubierta de glucoproteínas y polisacáridos que rodean a muchas células.

Existe actualmente la evidencia que indica la presencia de compuestos con hidratos de carbono en la superficie de todas las células, los que se pueden demostrar con la reacción de PAS y del *Alcian Blue*. Los estudios de microscopia electrónica confirman estos hallazgos.^{51, 52}

En muchos casos, estas cubiertas pueden ser consideradas como productos de muda salidos de la superficie celular. No son indispensables para la integridad de la célula, pero tienen funciones importantes, y como se verá más adelante, están implicadas primordialmente en la asociación de células, en los tejidos. A dichas cubiertas se les pueden atribuir las siguientes funciones:

a) *Propiedades inmunológicas.* En la superficie de las células de mamíferos existen sustancias específicas determinadas genéticamente, que corresponden a los grupos sanguíneos A, B y O. En la superficie de los eritrocitos, estas sustancias se encuentran firmemente unidas y contienen carbohidratos además de aminoácidos.⁵³

b) *Propiedades de filtración.* Las cubiertas extracelulares que rodean a muchos capilares en vertebrados, y especialmente el glomérulo renal, actúan como un filtro regulando el paso de moléculas de acuerdo con su tamaño. El ácido hialurónico en el tejido conectivo posee el efecto de controlar la difusión.

c) *Microambiente de la célula.* Las cubiertas externas pueden influir sobre la concentración de diferentes sustancias en la superficie de la célula, no sólo porque funcionan como barreras de difusión, sino también por su intervención en los cambios del ambiente catiónico de la célula. A este respecto son susceptibles de actuar como las resinas de intercambio iónico empleadas en química. Por ejemplo, una célula muscular con su membrana plasmática excitable está rodeada del glucocálix, que puede captar iones de sodio. Ciertos componentes, como el hialuronato, son capaces de cambiar radicalmente la carga eléctrica y el pH en la membrana celular. Debido a ello, se modifica la actividad de las enzimas presentes en la membrana plasmática, mientras se encuentran en el microambiente de la célula.⁵⁴

La importancia de las cubiertas externas en las interacciones celulares se estudiará en el capítulo 21.

El glucocálix en la mucosa gastrointestinal. En las microvellosidades de las células intestinales puede observarse una cubierta formada por delgados fila-

mentos de 0.1 a 0.5 μ de diámetro. Este material está asociado de manera íntima con la membrana plasmática y es probablemente continuación de ella.⁵⁵ Una característica de la cubierta es su estabilidad, puesto que no puede separarse de la chapa estriada subyacente, compuesta de microvellosidades. Técnicas histoquímicas permiten localizar una actividad de fosfatasa alcalina tanto en la cubierta como en las vellosidades. Todas las enzimas que intervienen en la digestión terminal de los hidratos de carbono y proteínas pueden hallarse en microvellosidades aisladas.^{56, 57}

En lo que respecta al origen de esta cubierta extracelular, los estudios de radioautografía a nivel del microscopio electrónico,⁵⁸ en los que se usan diversos precursores, como la glucosa- H^3 , glucosamina- C^{14} , galactosa- H^3 o manosa- H^3 , han demostrado que la radiactividad aparece primero en la región del aparato de Golgi y posteriormente se concentra en el glucocálix. El intervalo requerido para que el precursor se incorpore y sea transportado hasta el borde estriado es de 30 a 60 minutos. Estos estudios permiten suponer que es la misma célula la que proporciona su cubierta. Sin embargo, no está aún perfectamente establecido cómo el material es transportado desde la región del Golgi hasta su ubicación final (consúltese la sección sobre el Complejo de Golgi en el capítulo 10).

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Benedetti, E. L.: (1969) Cell membrane organization. *First Int. Symp. Cell Biol. and Cytopharmacol.* Venice, July 7-11.
- Emmelot, P.: (1968) Plasma membranes. *Excerpta med. Int. Congr.*, series 166:16.
- Fawcett, D. W.: (1958) Structural specialization of the cell surface. In: *Frontiers in cytology*. (Palay, S. L., ed.) Yale University Press, New Haven, Conn.
- Harris, E. J.: (1957) Transport through biological membranes. *Amer. Rev. Physiol.*, 19:13.
- Ito, S.: (1969) Structure and function of the glycocalyx. *Fed. Proc.*, 28:12.
- Robertson, J. D.: (1959) The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.*, 16:3.
- Sjöstrand, F. S.: (1967) The structure of cellular membranes. *Protoplasma*, 63:248.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Mercer, E. H. and Wolpert, L.: (1958) *Exp. Cell Res.*, 14:629.
- Maddy, A. H.: (1966) *Int. Rev. Cytol.*, 20:1.
- Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J.: (1963) *Arch. Biochem. Biophys.*, 100:119.
- Marchesi, V. T. and Steers, E.: (1968) *Science*, 159:203.
- Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. and Rumke, P.: (1964) *Biochim. biophys. Acta*, 90:126.
- Lapetina, E. G., Soto, E. F. and De Robertis, E.: (1968) *J. Neurochem.*, 15:437.
- Benedetti, E. L. and Emmelot, P.: *J. Cell Sci.*, 2:499.
- Bogoch, S.: (1957) *Nature*, 180:197.
- Balakrishnan, S. and McIlwain, H.: (1961) *Biochem. J.*, 81:72.

10. Lapetina, E. G., Soto, E. F. and De Robertis, E.: (1967) *Biochim. biophys. Acta*, 35:33.
11. Maddy, A. H.: (1964) *Biochim. biophys. Acta*, 88:448.
12. Rega, A.: (1967) *Biochim. biophys. Acta*, 147:297.
13. Mazia, D. and Ruby, A.: (1968) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 61:1005.
14. Farquard, M. and Palade, G. E.: (1966) *J. Cell Biol.*, 30:359.
15. Ponder, E.: (1953) *J. gen. Physiol.*, 36:723.
16. Mueller, P. and Rudin, D. O.: (1963) *J. theor. Biol.*, 4:268.
17. Thompson, T. E.: (1964) In: *Cell membranes in development*, p. 83. 22nd Symp. Soc. Study Develop. Growth. (M. Locke, ed.) Academic Press, New York.
18. Mitchison, J. M. and Swan, M. M.: (1954) *J. exp. Biol.*, 31:443.
19. Danielli, J. F.: (1952) *Symp. Soc. exp. Biol.*, 6:1.
20. Danielli, J. F. and Harvey, E. N.: (1934) *J. cell comp. Physiol.*, 5:483.
21. Lehninger, A. L.: (1968) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 60:1069.
22. Robertson, J. D.: (1959) *Biochem. Soc. Symp.*, 16:3.
23. Zetterquist, H.: (1956) *The ultrastructural organization of the columnar epithelial cells of mouse intestine*. Thesis, Karolinska Institute, Stockholm.
24. Sjöstrand, F. S.: (1963) *Nature*, 199:1262.
25. Sjöstrand, F. S.: (1963) *J. Ultrastruct. Res.*, 9:561.
26. Yamamoto, T.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:413.
27. Bennett, H. S.: (1963) *J. Histochem. Cytochem.*, 11:14.
28. Ito, S.: (1965) *J. Cell Biol.*, 27:475.
29. Roth, T. F. and Porter, K. R.: (1964) *J. Cell Biol.*, 20:313.
30. Bullivant, S. and Loewenstein, W. R.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:621.
31. Lucy, J. A.: (1964) *J. theor. Biol.*, 7:360.
32. Porter, K. R., Kenyon, K. and Badenhausen, S.: (1967) *Protoplasma*, 43:262.
33. Korn, E. D. and Weisman, R. A.: (1966) *Biochim. biophys. Acta*, 116:309.
34. Sjöstrand, F. S.: (1967) *Protoplasma*, 63:248.
35. Schmitt, F. O., Bear, R. S. and Palmer, K. T.: (1941) *J. cell comp. Physiol.*, 18:31.
36. Finean, J. B.: (1957) *Acta Neurol. Psychiat. Belg.*, 5:462.
37. Vanderhevel, F. A.: (1965) *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 122:57.
38. De Robertis, E. and Lasansky, A.: (1961) Ultrastructure and chemical organization of photo-receptors. In: *The structure of the eye*. (Smelser, G. K., ed.) Academic Press, New York.
39. Engström, A. and Finean, J. B.: (1958) *Biological ultrastructure*. Academic Press, New York.
40. Sjöstrand, F. S.: (1949) *J. cell comp. Physiol.*, 33:383.
41. Sjöstrand, F. S.: (1953) *Experientia*, 2:68.
42. De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:319.
43. De Robertis, E. and Lasansky, A.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:743.
44. Sjöstrand, F. S.: (1956) *Int. Rev. Cytol.*, 5:455.
45. Fawcett, D.: (1958) Structural specializations of the cell surface. In: *Frontiers in cytology*. (Palay, S. L., ed.) Yale University Press, New Haven, Conn.
46. Kelly, D. E.: (1966) *J. Cell Biol.*, 28:51.
47. Wood, R. L.: (1959) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6:343.
48. Locke, M.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25:166.
49. Gouranton, J.: (1967) *J. Microscopic.*, 6:505.
50. Farquard, M. and Palade, G. E.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:375.
51. Revel, J. P. and Karnowsky, M. J. (1967) *J. Cell Biol.*, 33:67.
52. Rambourg, A. and Leblond, C. P. (1967) *J. Cell Biol.*, 32:27.
53. Kabat, E. A. and Mayer, M. A.: (1958) *Exp. immunochemistry*. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
54. Weiss, L.: (1963) *Biochem. Soc. Symp.*, 22:32.
55. Ito, S.: (1969) *Fed. Proc.*, 28:12.
56. Miller, D. and Crane, R. K.: (1961) *Biochim. biophys. Acta*, 52:293.
57. Ugolev, A. M.: (1965) *Physiol. Rev.*, 45:555.
58. Ito, S., Revel, P. and Goodenough, D. A.: (1967) *Biol. Bull.*, 133:471.

QUINTA PARTE

EL CITOPLASMA Y LOS ORGANOIDES CITOPLASMATICOS

En los tres capítulos que siguen se realiza el estudio estructural, bioquímico y fisiológico del citoplasma y de los principales organoides que contiene. La presentación de este material, basada en los últimos estudios de microscopia electrónica y citoquímica, y en el conocimiento de la evolución estructural de los sistemas biológicos, difiere considerablemente de lo que se ha enseñado en Citología hasta hace poco tiempo. El citoplasma fundamental comprende: a) la matriz citoplásmica, verdadero medio interno de la célula susceptible de llevar a cabo las funciones biosintéticas esenciales, y b) los ribosomas, componentes ribonucleoproteicos fundamentales para los procesos de síntesis proteica. Los ribosomas y el problema de su biogénesis serán considerados en el capítulo 18.

En esta parte de la obra se encontrarán algunos conceptos clásicos, como el del aparato de Golgi, del ergastoplasma y otros, con las nuevas nociones aportadas por la microscopia electrónica. Se verá que en el citoplasma existe un sistema vacuolar o citocavitario con distintas porciones que van desde la envoltura nuclear a las diversas membranas del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi. Por medio de estos estudios es posible presentar una idea dinámica de las diversas membranas intracelulares y de las importantes funciones que ellas desempeñan. El sistema vacuolar subdivide al citoplasma en múltiples compartimientos que pueden actuar en forma independiente. Este sistema tiene funciones de intercambio, circulación, segregación y secreción de los productos absorbidos o que fueron sintetizados a nivel de los ribosomas.

El citoplasma es, en general, la parte de la célula donde se producen la mayoría de las funciones metabólicas y biosintéticas. El citoplasma se diferencia, debido a la actividad de los genes contenidos en el núcleo, adaptándose a la división celular del trabajo. Debido a ello puede presentar diferenciaciones como miofibrillas, neurotúbulos, tonofibrillas y otras, que serán estudiadas en los capítulos correspondientes.

Este es, a no dudarlo, uno de los campos que mayor beneficio ha obtenido de la Citoquímica y la microscopia electrónica, y donde son más considerables los cambios conceptuales. En los últimos años, igualmente, se efectuaron estudios trascendentales sobre las mitocondrias y cloroplastos. El lector podrá apreciar de qué manera admirable se integran en estos organoides la estructura con la función en el seno de la organización química y molecular. Además, se verá que estos organoides contienen ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico soluble (ARNs), ribosomas y otros componentes, que les permiten efectuar síntesis de proteínas. Dichas propiedades les confieren cierto grado de autonomía dentro de la célula.

El capítulo 12 sobre célula vegetal incluye, asimismo, algunas referencias sobre la pared celular y sobre las características propias de los componentes citoplásmicos.

10

El citoplasma

En el capítulo 1, al hablar de la mínima masa de materia viviente, se dijo que entre los organismos *procariontes*, en los que falta un verdadero núcleo, y los *eucariontes*, existen diversas formas intermedias. En las figuras 1-3 y 2-5 se han representado dos grados extremos en la estructura celular: una célula bacteriana y una célula de un organismo superior, respectivamente. A simple vista las diferencias son extraordinarias, pero si uno considera ambas estructuras al mismo nivel de su organización, las similitudes son también notables. La mayor parte del citoplasma de una célula está constituido por los mismos componentes de los pequeños elementos bacterianos. Los ribosomas, las moléculas de ácido ribonucleico (ARN), las proteínas globulares y fibrosas que incluyen muchas enzimas y el agua que constituye la masa molecular básica de la célula primitiva se encuentran presentes en la denominada *matriz citoplásmica* de la célula superior. En el curso de la evolución se agregaron las numerosas membranas intracelulares, produciéndose la segregación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de otras moléculas hacia el interior del núcleo y la formación de muchos organoides celulares (mitocondrias, cloroplastos, centriolos etc.). También en ciertos vegetales y en células animales embrionarias, la mayor parte del citoplasma puede estar compuesta por la matriz con los ribosomas y existir un pequeño desarrollo de membranas intracelulares (fig. 10-1).

Con estos conceptos básicos, se comprende fácilmente que la matriz citoplásmica es la *parte más importante de la célula* y constituye su verdadero *medio interno*. Lleva a cabo las funciones biosintéticas y contiene las enzimas que producen principalmente ener-

gía por medio de la glucólisis anaerobia (véase capítulo 5).

De esta región del citoplasma también dependen en gran medida las propiedades coloidales básicas de la célula, como aquellas en las que están implicadas las transformaciones sol-gel, cambios en la viscosidad, movimiento intracelular o ciclosis, ameboidismo, formación del huso y división celular. Más aún, la matriz citoplasmática es el sitio de muchas diferenciaciones fibrilares que se encuentran en células especializadas: fibras de queratina, miofibrillas, microtúbulos y filamentos, que serán estudiadas más adelante.

Notas históricas sobre el citoplasma

Debido a las imitaciones del poder de resolución del microscopio óptico, el citoplasma se evidenciaba en un principio como una región vacía, homogénea, anhistá, en la que existían algunas partículas representadas por mitocondrias, vacuolas e inclusiones (figuras 2-2 y 10-6). Por ello fue denominado *matriz, citoplasma fundamental* o *hialoplasma*.

Ergastoplasma. A fines del siglo pasado se descubrió que en ciertas células más que en otras hay un citoplasma fundamental con propiedades tintóreas diferentes. Debido a que esta porción se teñía con colorantes básicos, del mismo modo que lo hace el núcleo, recibió el nombre de *citoplasma basófilo* o *chromidial* (Hertwig). El término aún muy en boga de *ergastoplasma* (del griego: *ergazo-mai*, elaborar y transformar) fue creado por Garnier, en 1887, para significar el papel fundamental, ya intuitivo, de esta sustancia en la síntesis proteica.

El ergastoplasma incluye regiones basófilas del citoplasma fundamental, como los cuerpos

de Nissl de las células nerviosas, el citoplasma basal de las células de secreción serosa (páncreas, parótida, células principales del estómago), los acúmulos basófilos de las células hepáticas, etcétera. Posteriormente, los estudios citoquímicos realizados por Caspersen, Brachet y otros demostraron que la intensa

basofilia del ergastoplasma se debe a la presencia de ácido ribonucleico (figs. 7-4 y 10-2). En efecto, las propiedades de coloración del ergastoplasma desaparecen con el tratamiento previo de las células por la ribonucleasa, enzima que hidroliza a dicho ácido (figs. 7-4 y 10-2). Como consecuencia de estos estudios

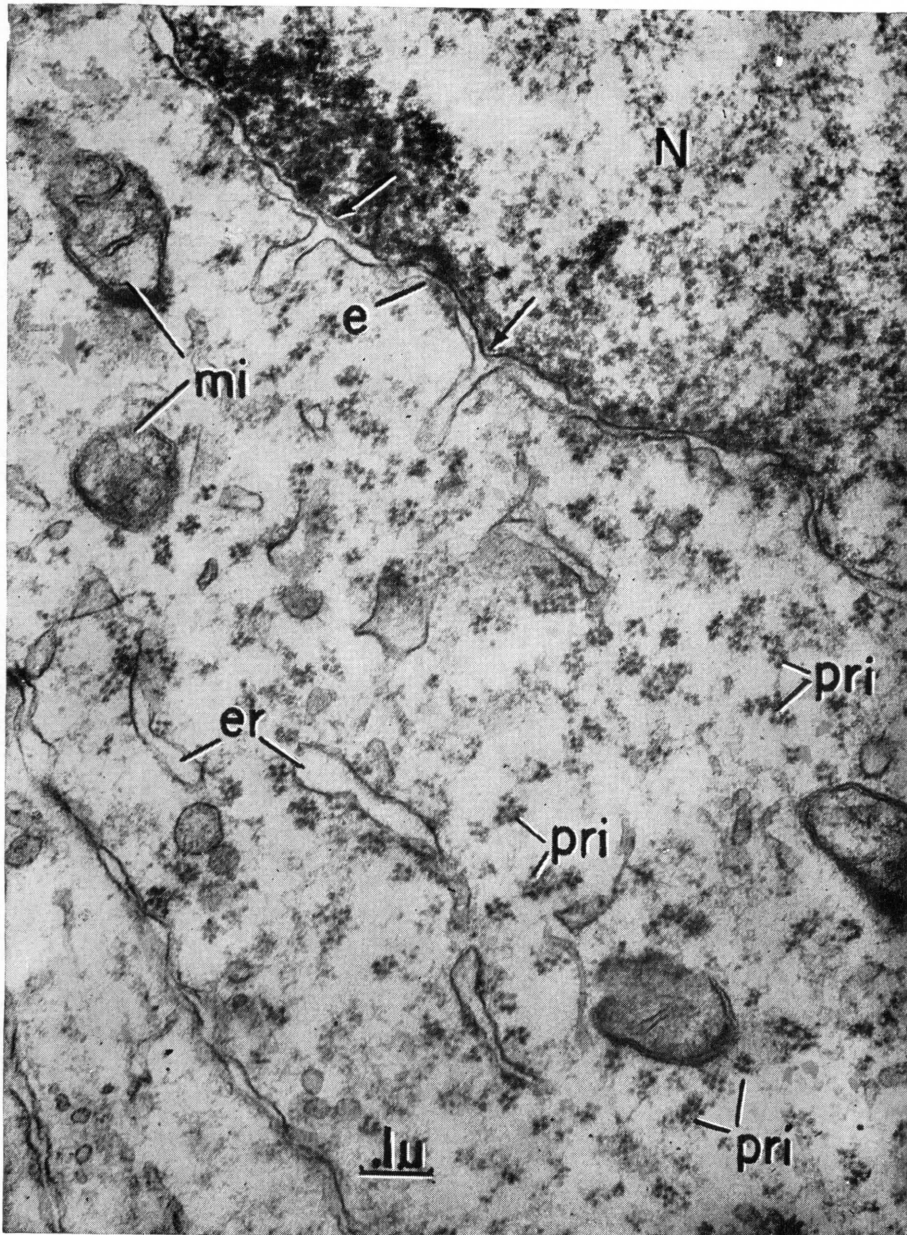


FIG. 10-1. Fotomicrografía electrónica de un neuroblasto de la corteza cerebral del embrión de rata, poniendo de manifiesto el citoplasma rico en matriz con numerosos ribosomas y poco desarrollo del sistema vacuolar. N, Núcleo; e, membrana nuclear enviando proyecciones al citoplasma (flechas); er, retículo endoplásmico; mi, mitocondrias; pri, polirribosoma o grupos de ribosomas. 45,000 $\times$. (De E. De Robertis.)

se postuló la relación existente entre el contenido de ARN y la síntesis proteica.

Aparato o complejo de Golgi. En 1898, utilizando el método de impregnación argéntica, Golgi descubrió en el citoplasma fundamental una estructura que tenía aspecto reticular. El nombre de "aparato" dado por Golgi a esta estructura es confuso, puesto que sugiere una relación definida con los procesos fisiológicos de la célula. Parece más apropiado denominarla "sustancia de Golgi" o "complejo de Golgi", para referirse a un material que posee propiedades tintóreas especiales (figura 10-3).

La sustancia de Golgi resulta difícil de observar en las células vivientes, debido a que su índice de refracción es semejante al del hialoplasma. De este hecho ha resultado a través de los años una enorme y confusa literatura, que en su mayoría debe descartarse.^{1, 2, 3, 4}

El empleo del microscopio electrónico esclareció considerablemente la noción de la sustancia de Golgi y en la actualidad está bien establecida su estructura submicroscópica. El complejo de Golgi se compone principalmente de un sistema de membranas intracelulares y puede considerarse ahora como una parte diferenciada del sistema mem-

branáceo del citoplasma (véase más adelante).

Primeros estudios submicroscópicos sobre el citoplasma

Antes de la introducción del microscopio electrónico se obtuvieron algunos indicios de una organización más fina del hialoplasma. En 1910, Gaidukow observó con el ultramicroscopio la presencia de cuerpos refringentes en partes del citoplasma que aparecerían como vacías con la luz transmitida. En 1920, Bayliss, empleando una método similar, encontró en el hialoplasma de amebas pequeñas partículas que tenían un activo movimiento browniano. El uso de la microscopia de polarización puso de manifiesto algunos datos adicionales sobre la estructura fina de la sustancia fundamental. En la mayoría de las células, el hialoplasma es isotrópico y aparece oscuro entre prismas cruzados. Sin embargo, ciertas regiones del citoplasma pueden evidenciar una débil birrefringencia, particularmente cuando la célula se halla sometida a fuerzas mecánicas. Se ha encontrado birrefringencia en diversas células epiteliales,⁵ observándose en la corteza de algunos huevos una birrefringencia diferente que es positiva en la dirección radial.^{6, 7} Cuando se extiende el citoplasma de un plasmodio con una microaguja y también durante la formación de pseudópodos o en la fertilización de ciertos huevos, puede producirse birrefringencia debida a una estructura fibrilar.

En células en cultivo que fagocitaron pequeñas partículas magnéticas y que luego fueron sometidas a campos magnéticos, se observó un retroceso elástico, lo cual también indica la presencia de partículas asimétricas en la matriz citoplásmica.⁸

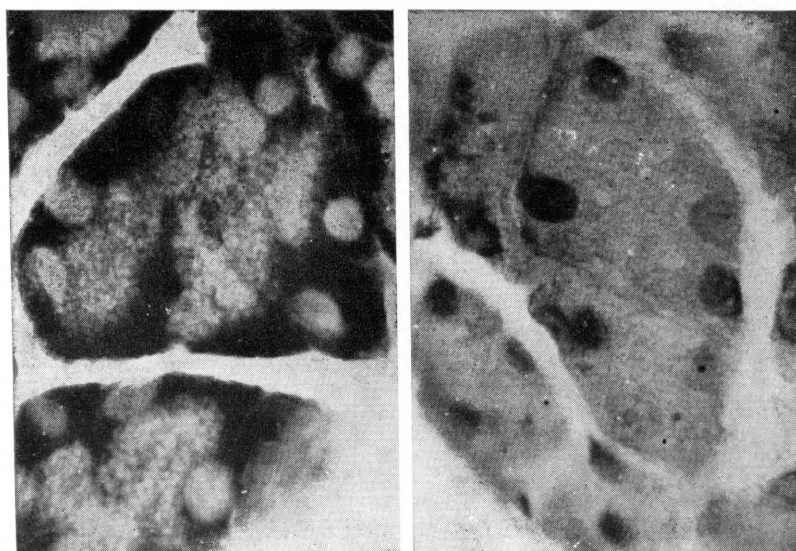


FIG. 10-2. *Izquierda.* Célula del ácino pancreático congelado, desecado y coloreado con azul de toluidina. La sustancia basófila o ergastoplasma aparece intensamente teñida. *Derecha.* El mismo tejido, pero después de la digestión con ribonucleasa. Se observa la desaparición de la basofilia. (De E. De Robertis y col., 1945.)

Algunas propiedades fisicoquímicas de la matriz citoplásmica

Se ha dicho anteriormente que algunas de las propiedades básicas coloidales de la célula residen en la matriz citoplásmica. Desde este punto de vista la matriz, junto con las membranas intracelulares del sistema vacuolar, pueden ser consideradas como un *sistema coloidal* sumamente heterogéneo o *polifásico*. Esta organización compleja implica una armazón de largas cadenas macromoleculares o agregados moleculares susceptibles de interactuar por medio de uniones reversibles. Se mencionarán algunas propiedades fisicoquímicas que pueden ser explicadas sobre la base de este sistema coloidal polifásico:

a) *Polaridad de los huevos*. Después de ser centrifugados, ciertos huevos presentan una estratificación considerable de los componentes celulares (figura 2-3), a pesar de lo cual se mantiene la polaridad original durante la división celular.⁹ Ello indica que esta propiedad radica probablemente en la matriz celular y que ésta resiste las deformaciones producidas por la centrifugación.

b) *Acción de la presión hidrostática*. Cuando se aplican presiones hidrostáticas moderadas a las células, se inhibe un grupo de actividades fisiológicas que están relacionadas con los cambios sol-gel.¹⁰ Estos se producen en la ciclosis, el movimiento ameboidal, la división celular y la migración de pigmentos en los cromatóforos. La inhibición se debe al grado de solación que la presión induce en el sistema plasmagel y a los cambios resultantes de viscosidad.¹¹

En ciertas ocasiones el citoplasma, cuando está repleto de partículas, muestra un comportamiento raro y la viscosidad aumenta después de aplicar la fuerza.

c) *Cambios en la viscosidad*. La viscosidad de diferentes células cambia por la acción de factores internos o del medio que las rodea. Como se observa en las figuras 10-4, la viscosidad relativa de las amebas y de otras células depende de la *temperatura* y manifiesta cambios reversibles dentro de ciertos límites.¹² Por encima de los 30°C, como en el caso de *Cummingia*, la viscosidad aumenta abruptamente tan pronto como la célula es alterada de manera irreversible por el calor. La *anaerobiosis* produce en general una disminución de la viscosidad del protoplasma. Las soluciones hipertónicas aumentan la viscosidad y, a la inversa, las soluciones hipotónicas producen su disminución. Durante el ciclo mitótico y en el movimiento ameboidal existen continuos cambios en la viscosidad. La célula posee la propiedad de absorber y eliminar agua y ésta puede ser, junto con otros factores, la razón de los cambios de viscosidad. En la tabla 10-1 se han indicado algunos valores de viscosidad encontrados en diferentes células.

d) *Propiedades mecánicas*. Algunas de las propiedades mecánicas de la célula, la elasticidad, contractilidad, cohesión y rigidez, movimientos intracelulares, etcétera, pueden estar relacionadas con la matriz citoplásmica, aunque otros componentes como el sistema vacuolar pueden servir de base física a estas propiedades. En ese sentido la matriz es la parte del citoplasma menos compacta, en oposición

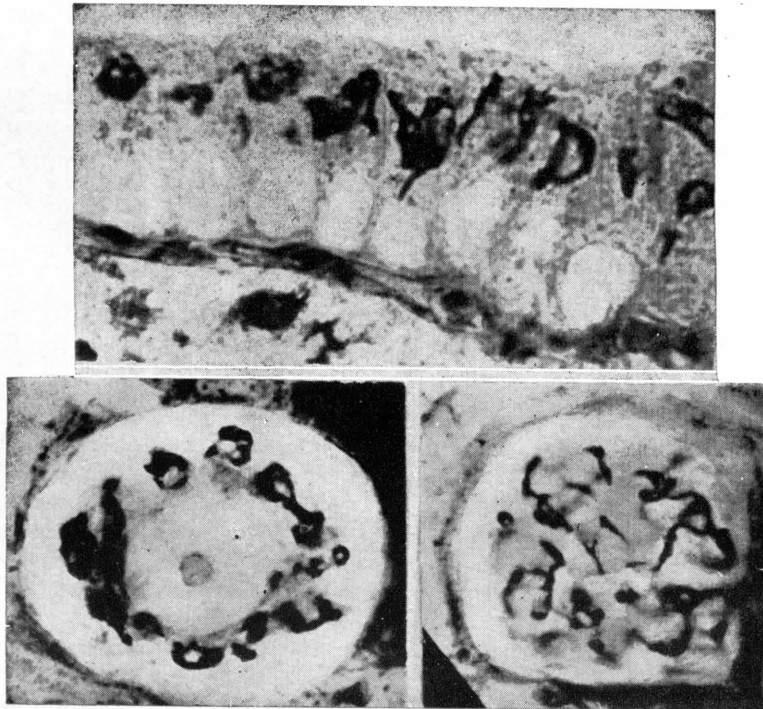


FIG. 10-3. Arriba. Aparato de Golgi en células tiroideas del cobayo, posición apical. Impregnación ósmica. Abajo, izquierda. Célula ganglionar, aparato de Golgi perinuclear. Abajo, derecha. Idem. Sección óptica tangencial respecto al núcleo. Impregnación argéntica.

TABLA 10-1. Viscosidad de diversas células
(De Heilbrunn 13)

<i>Sustancia</i>	<i>Temperatura ° C</i>	<i>Viscosidad en centipoises</i>
Agua	25	0.8937
Solución de sacarosa (20%)	20	1.960
Solución de sacarosa (60%)	20	56 5
Fibra nerviosa	20	5 5
Ameba dubia	18	2
Hongo ameboide	20	9 a 18
Chara	20	10
Huevo de Arbacia	20	7
Paramecio	20	50

a los sistemas de membranas, donde la densidad molecular es alta.

e) *pH y oxirreducción del citoplasma.* La inyección de indicadores de pH, cuyo color cambia con la concentración de iones de H^+ del medio, permite determinar el pH del citoplasma y de otras partes de la célula. Los indicadores más usados son sales de ácido sulfónico solubles en agua, las cuales, después de haber sido microinyectadas, colorean difusamente la fase acuosa continua del protoplasma. Se han registrado diferencias del pH por lo menos en tres regiones de la célula. En general, la matriz citoplásmica tiene un pH ligeramente ácido, de 6.8 aproximadamente.

En la ameba, el pH se determina mejor después de desplazar el material granuloso por centrifugación. En las células animales, pero más especialmente en los protozoarios y en las células vegetales, se encuentran vacuolas rodeadas de membranas cuyas propiedades son similares a las de la membrana plasmática. Estas vacuolas pueden tener un contenido básico o un contenido ácido, con un pH tan bajo como 5. La tercera región de la célula con pH diferencial es la matriz nucleoplásmica del núcleo, que

en una variedad de células animales y vegetales tiene un pH de 7.6 a 7.8.^{14, 15}

Es característico del protoplasma su poder amortiguador. El pH celular puede alterarse por la adición al medio de ácidos o álcalis o por inyección de éstos, pero vuelve rápidamente a su valor primitivo mientras la vitalidad de la célula no se altere.¹⁶

El *potencial de oxirreducción* (o capacidad reductora del citoplasma) puede determinarse introduciendo en las células ciertos colorantes que tengan la propiedad de cambiar de color o de colorarse cuando son reducidos por la célula. Esta propiedad es de suma importancia porque depende de la tensión parcial de oxígeno del medio, de la concentración de los sistemas enzimáticos y de los metabolitos que se encuentran en la célula. Más aún, es un índice de cómo la energía química es aprovechada por la célula. En la ameba el potencial de oxirreducción del citoplasma es de aproximadamente 0.275 voltios en anaerobiosis y de 0.070 en presencia de oxígeno.

Organización química de la matriz citoplásmica

La mayor parte del contenido proteico de la matriz se encuentra en forma de proteínas globulares, pero pueden aparecer estructuras fibrilares en ciertas actividades fisiológicas. Uno de los ejemplos mejor conocidos de ese proceso es el desarrollo de los ásteres y del huso, que forman el aparato mitótico de la célula. Esto será considerado desde un punto de vista estructural y químico en el capítulo 13.

Siguiendo el método de fraccionamiento celular indicado en el capítulo 7, después de la separación de las fracciones nuclear, mitocondrial y microsómica, el sobrenadante restante o *fracción soluble* (fig. 7-5) contiene

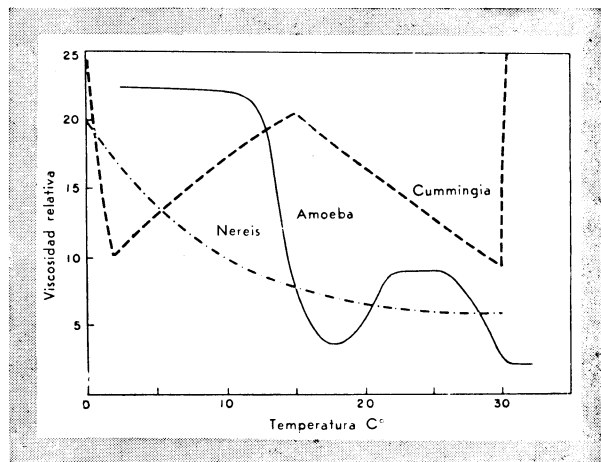


FIG. 10-4. Cambio en la viscosidad de diversas células con variaciones en la temperatura.
(De Heilbrunn.)

ne las proteínas y enzimas solubles de la matriz citoplásmica. Éstas pueden representar alrededor del 20 al 25 por ciento del contenido proteico total de la célula. Entre las importantes *enzimas solubles* presentes en la matriz, se encuentran aquellas relacionadas con la glucólisis anaerobia (véase cap. 5) y la activación de aminoácidos para la síntesis proteica.

Las enzimas de muchas reacciones que requieren ATP también se hallan en esta fracción soluble, lo mismo que el ARN soluble o de transferencia (véase cap. 17).

Ultraestructura de la matriz citoplásmica

Con el microscopio electrónico la matriz citoplásmica aparece homogénea o finamente granular y posee una baja densidad electrónica. En algunas células se observan delgados filamentos de menos de 100 Å, los cuales son particularmente visibles cuando están organizados en disposición paralela. Se supone que estos filamentos pueden polimerizarse en la matriz en respuesta a presiones del medio durante los movimientos celulares o como parte de la organización celular para la división celular. Dichos filamentos dan presumiblemente a la célula su consistencia gelificada. Las fibrillas de queratina y las miofibrillas están constituidas por una organización de filamentos de tamaño semejante al de las proteínas estructurales.

Con el adelanto de las técnicas pudo comprobarse que la organización macromolecular de la matriz celular varía en diferentes células y también en diferentes regiones de la propia matriz. Por ejemplo, en las células intestinales existe un sistema de finos filamentos debajo de la membrana apical, que forman el llamado retículo terminal. Otros filamentos se concentran a ambos lados de los desmosomas.

Todos estos hechos sugieren la existencia de componentes alargados que permitirían el mantenimiento de las relaciones estructurales del protoplasma. En la actualidad, se considera que en el enrejado formado por estas proteínas estructurales, las cadenas de polipéptidos pueden estar unidas por fuerzas de van der Waals, por puentes de hidrógeno y aun por uniones más fuertes. La transformación de un sol en un gel y viceversa, en una región particular del protoplasma, puede producirse por cambios en la fuerza de estas

uniones, así como en el grado de plegamiento, de elongación o agregación de las cadenas proteicas. Estos componentes filamentosos no necesitarían estar vinculados constantemente entre sí, porque podrían existir fuerzas de largo alcance capaces de mantenerlos unidos, conservándose de esta forma la cohesión del protoplasma.

El estudio de la estructura y función de la matriz citoplásmica continúa en el capítulo 22, en el que se describen los microtúbulos, las corrientes citoplásmicas y el movimiento ameboidal.

SISTEMA VACUOLAR

El concepto de *sistema vacuolar* se introdujo por primera vez en el capítulo 2. Se dijo entonces que, en el transcurso de la evolución citológica, el citoplasma fue atravesado por numerosas membranas intracelulares que lo subdividen en compartimientos y subcompartimientos.

Como se aprecia en los esquemas de las figuras 2-5 y 12-3, que corresponden a células típicas de animales y vegetales superiores, el citoplasma se halla atravesado por un complejo sistema de túbulos, vesículas y sacos aplanados, también llamados cisternas, que están constituidos por membranas y presentan frecuentes intercomunicaciones. Este sistema membranoso debe interpretarse, desde el punto de vista de su disposición tridimensional, como un vasto retículo de cavidades abiertas o virtuales, que subdividen al citoplasma en dos compartimientos principales; uno situado en el interior de las membranas y el otro por fuera de ellas. Este último ya ha sido estudiado con el nombre de matriz citoplásmica.

El término descriptivo de *sistema vacuolar citoplásmico* parece ser el más apropiado para designar esta organización membranosa intracelular que comprende, como principales componentes, el *retículo endoplásmico* con sus *porciones granular y agranular*, la *membrana nuclear* y el *complejo de Golgi*. En el esquema de la figura 2-5 se ha recalcado que estas diferentes porciones del sistema vacuolar pueden intercomunicarse en ciertos puntos por canales permanentes o temporarios.

En el capítulo 21, juntamente con el estudio de la *endocitosis* (propiedad de ingerir grandes cantidades de sustancia por invaginación de la membrana plasmática) y del *lisosoma*, se mencionarán nuevamente las co-

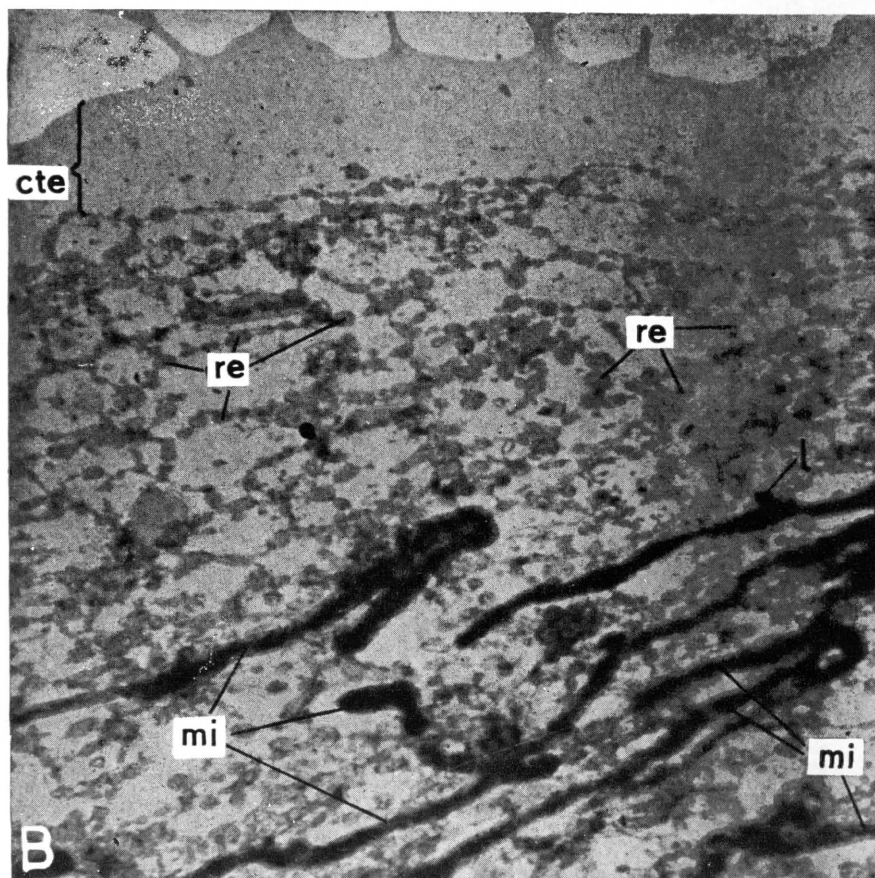
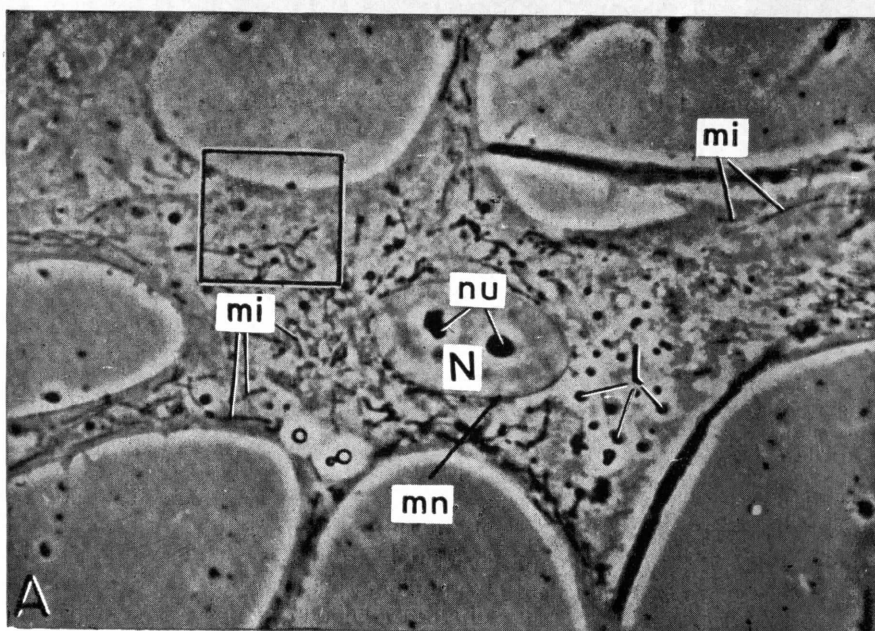


FIG. 10-5. A Célula viviente en cultivo de tejido observada con el microscopio de fase. nu, nucléolo; mi, mitocondria; mn, membrana nuclear; l, lípidos. La zona indicada en el recuadro es aproximadamente similar a la que se ve en B. (Cortesía de D. W. Fawcett.) B Fotomicrografía electrónica de la región marginal de un fibrocyto de rata en cultivo de tejidos semejantes al A. mi, mitocondrias filamentosas; re, retículo endoplásmico. La zona externa (cte) es homogénea. 7000 X. (Cortesía de K. R. Porter.)

nexiones temporarias que el sistema vacuolar posee con la membrana plasmática. Se describirá un *espacio extracelular* o *exoplásmico*, diferente del intracelular. Se demostrará, además, que el flujo de sustancias entre dos sistemas ocurre desde el espacio intracelular al exoplásmico, pero no a la inversa.

El descubrimiento del sistema vacuolar sólo fue posible cuando se dispuso de técnicas para observar con el microscopio electrónico células intactas en cultivo y en cortes delgados. Se realizaron otros avances por medio de la aplicación de métodos de fraccionamiento celular, seguidos del análisis bioquímico y el empleo de técnicas citoquímicas para el estudio de componentes específicos —en particular de las enzimas—, tanto en el nivel del microscopio óptico como del electrónico. Lo mismo que en muchos otros capítulos de la Biología celular, se obtuvieron rápidos progresos por la convergencia de diversas técnicas y métodos científicos.

Los conocimientos recientes acerca de la organización estructural de la célula tuvieron una repercusión considerable en la bioquímica y fisiología celular. No se puede considerar más a la célula como una bolsa que contiene enzimas, ARN, ADN y solutos rodeados de una membrana externa, como sucede en las bacterias más primitivas (fig. 1-3). En el curso de este capítulo se verá que los numerosos compartimientos bordeados de membranas son responsables de importantes funciones celulares, entre las cuales se encuentran: la segregación y asociación de sistemas enzimáticos, la existencia de barreras de difusión, potenciales de membranas, gradientes iónicos, diferentes grados de pH intracelulares y otras manifestaciones de heterogeneidad celular. Más aún, existen muchas evidencias de que las enzimas se encuentran organizadas especialmente, formando sistemas multienzimáticos dentro de la armazón membranaea insoluble de la célula. Esta es la razón por la cual en la célula no deben considerarse reacciones enzimáticas individuales sino sistemas enzimáticos que pueden trabajar en forma integrada.¹⁷ Junto con el sistema vacuolar, se estudiará la *fracción microsómica* de la célula. Los microsomas no representan un componente específico de ésta; constituyen, en cambio, una colección muy heterogénea de estructuras que pueden aislarse por centrifugación. Los principales elementos de los microsomas son el sistema vacuolar y los ribosomas.

Morfología general del sistema vacuolar

En 1945, las primeras observaciones de fibroblastos en cultivo revelaron un componente reticular en el citoplasma. Estos hallazgos se ilustran en la figura 10-5. Mientras que examinado con el microscopio de fase el citoplasma de una célula viviente carece de estructura, exceptuando las mitocondrias y algunas inclusiones, en un espécimen similar pero fijado, el microscopio electrónico revela un componente reticular especial. Se trata de un retículo formado por cavidades bordeadas de membranas que pueden variar considerablemente en tamaño y forma. En vista de que el retículo está más concentrado en el endoplasma de la célula que en el ectoplasma o región periférica, se propuso el nombre de *retículo endoplásmico* (RE).³ Además de vesículas y túbulos, este sistema consta de grandes sacos aplanados o cisternas. La fotomicrografía electrónica de una célula cultivada y examinada *in toto* proporciona una vista tridimensional del retículo endoplásmico. En ella se observan con facilidad la forma, distribución e interconexiones de los túbulos, vesículas o cisternas a lo largo de todo el citoplasma.

Un estudio más detallado del sistema vacuolar se hizo en cortes finos que permitieron observar su heterogeneidad en diferentes células y, aun dentro de un mismo tipo celular, en las diversas regiones citoplásmicas.^{19,23}

Se produjo una complicación mayor con el descubrimiento de los ribosomas, que pueden encontrarse libres en la matriz celular o, con mayor frecuencia, adheridos a algunas partes del sistema vacuolar.

Con el objeto de simplificar, y basados en la localización dentro de la célula, asociación con los ribosomas y morfología general, subdividiremos las membranas del sistema vacuolar en las siguientes clases (fig. 2-5): a) membranas del *retículo endoplásmico* con sus porciones *granular* y *agranular*; b) *membrana nuclear* y algunas *diferenciaciones especiales* (véase capítulo 16); c) *membranas del complejo de Golgi* con los componentes vesiculares de la *centrosfera*. En la figura 10-6, el sistema vacuolar con sus diversos componentes está representado en forma tridimensional. Las flechas indican las posibles relaciones existentes entre las porciones granular

y agranular del retículo y el complejo de Golgi.

Retículo endoplásmico (RE)

Al comienzo de los primeros estudios con el microscopio óptico, surgió con frecuencia la objeción de que el sistema vacuolar pudiera ser un artificio de técnica. Esto ya no es válido. Los componentes del RE han sido observados empleando otros fijadores además del tetróxido de osmio, incluyendo la fijación por congelación-dsecación (véase cap. 7). En algunas células vivientes, se pueden ver asimismo los grandes sacos aplanados por medio de la microscopia de fase. Con cinematografía de células en cultivo también se han observado estructuras que tienen la forma característica de los elementos del RE.^{25, 26}

Como se dijo antes, el desarrollo del RE varía considerablemente según los diferentes tipos celulares. Está por lo común ausente en huevos y en células embrionarias

o indiferenciadas y aumenta con la diferenciación.

En los espermatocitos aparecen sólo unas pocas vacuolas. El RE es asimismo simple en células que tienen un metabolismo lipídico como las células adiposas, las de la grasa parda y las de la corteza suprarrenal; sin embargo, en células intersticiales de los testículos de la zarigüeya existe una considerable cantidad de RE agranular.²⁷ Por el contrario, en células que intervienen activamente en la síntesis de proteínas, como las del ácino pancreático (fig. 10-7), y en la base de las células mucíparas o caliciformes, este sistema está altamente desarrollado y constituido por grandes cisternas cubiertas de ribosomas (RE granular). En las células hepáticas se ha establecido que las regiones ricas en depósito de glucógeno contienen un RE tubuloso agranular, mientras que las regiones basófilas tienen un RE granular compuesto por cisternas. No obstante, en muchos puntos se aprecia la continuidad entre ambos tipos de RE (fig. 10-8).

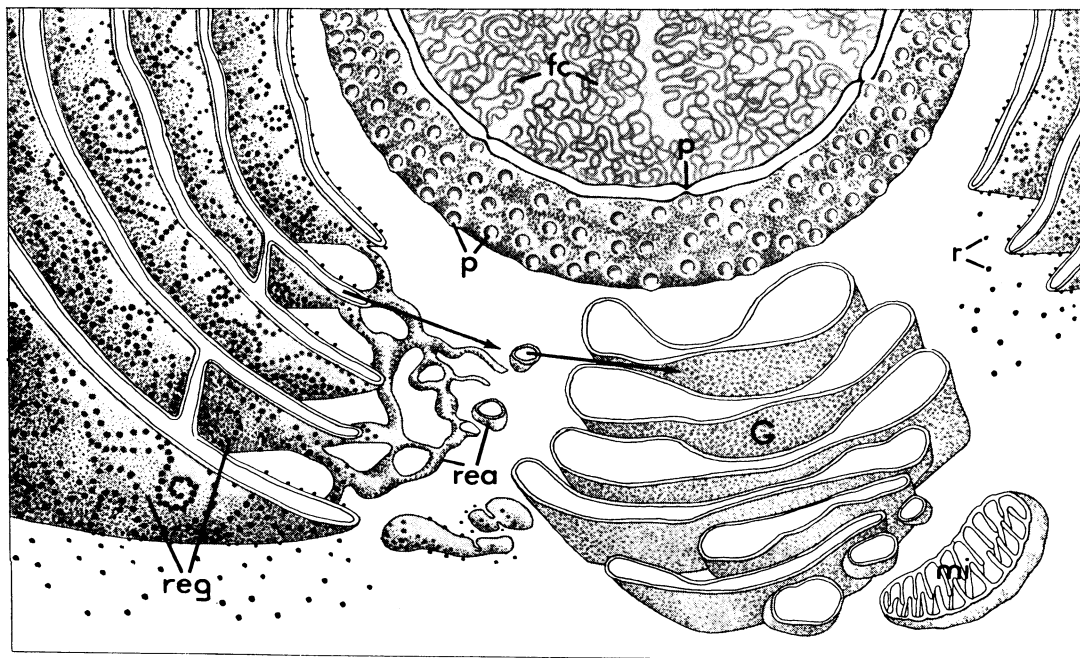


FIG. 10-6. Esquema tridimensional del sistema vacuolar de la célula. Se observa el núcleo con las fibrillas cromosómicas (*fc*) y los canales intercromatinicos (*flechas*) que se dirigen hacia los poros (*p*). Véase la doble membrana de la envoltura nuclear. Se ven cisternas del retículo endoplásmico granular (*reg*) que están interconectadas y presentan ribosomas en la superficie externa. Algunas cisternas se continúan con túbulos de retículo endoplásmico agranular (*rea*). *G*, complejo de Golgi; *mi*, mitocondria; *r*, ribosomas libres. Las flechas largas indican la probable relación dinámica de las distintas porciones del sistema vacuolar.

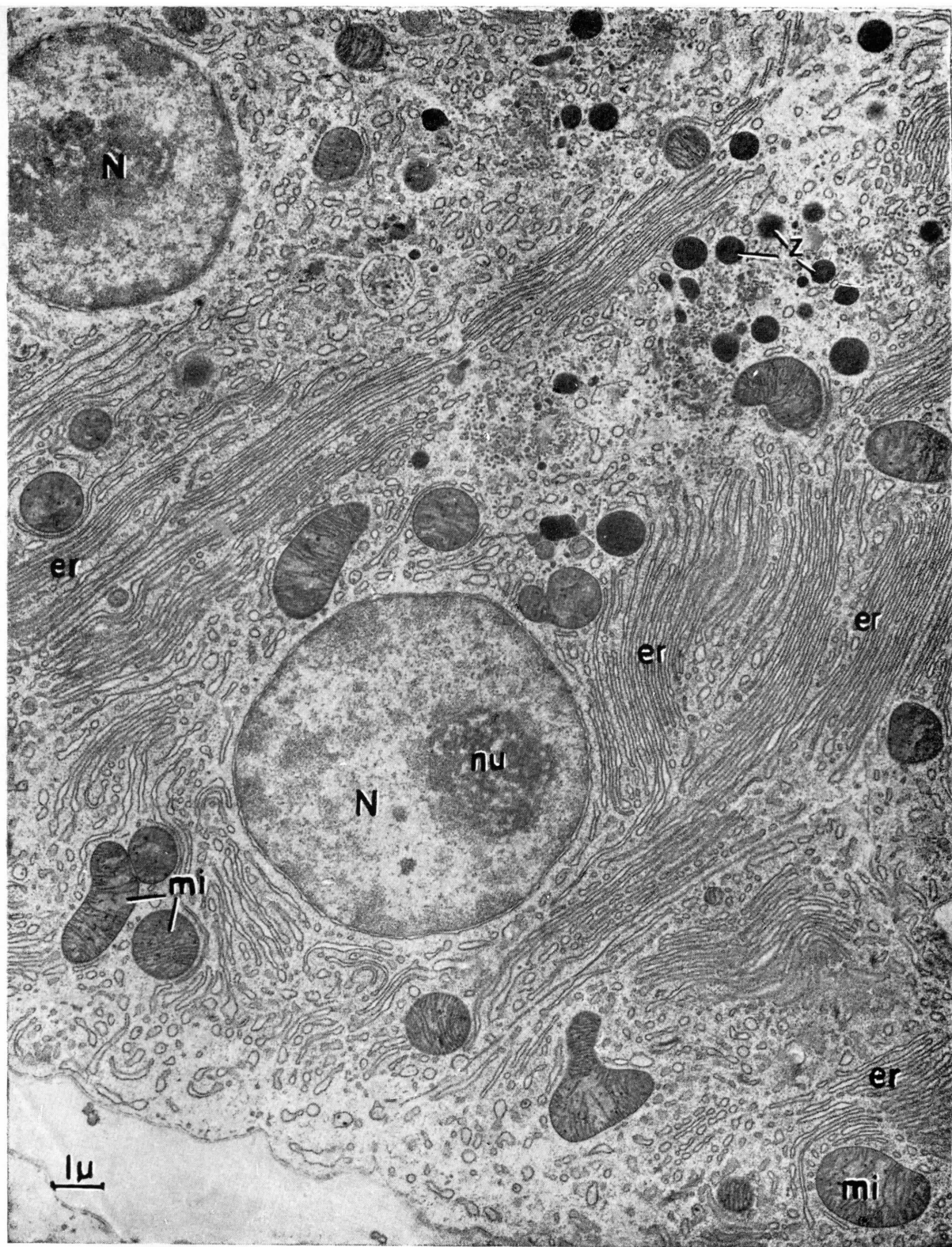


FIG. 10-7. Fotomicrografía electrónica con bajo aumento en la cual se observa la organización submicroscópica de una célula del ácino pancreático. En las regiones basal y lateral, la célula es rica en retículo endoplásmico granular (er). En el ápex aparecen los gránulos de zimógeno (z). N, Núcleo; nu, nucléolo; mi, mitocondrias. 8000 $\times$. (Cortesía de K. R. Porter.)

La cavidad del RE es a veces virtual, con las dos membranas casi en contacto, pero más frecuentemente hay un espacio verdadero entre ellas que puede estar ocupado por mate-

rial de opacidad variable. En ciertas células que poseen una activa síntesis proteica este espacio suele estar muy distendido; tal ocurre con las células plasmáticas y caliciformes,

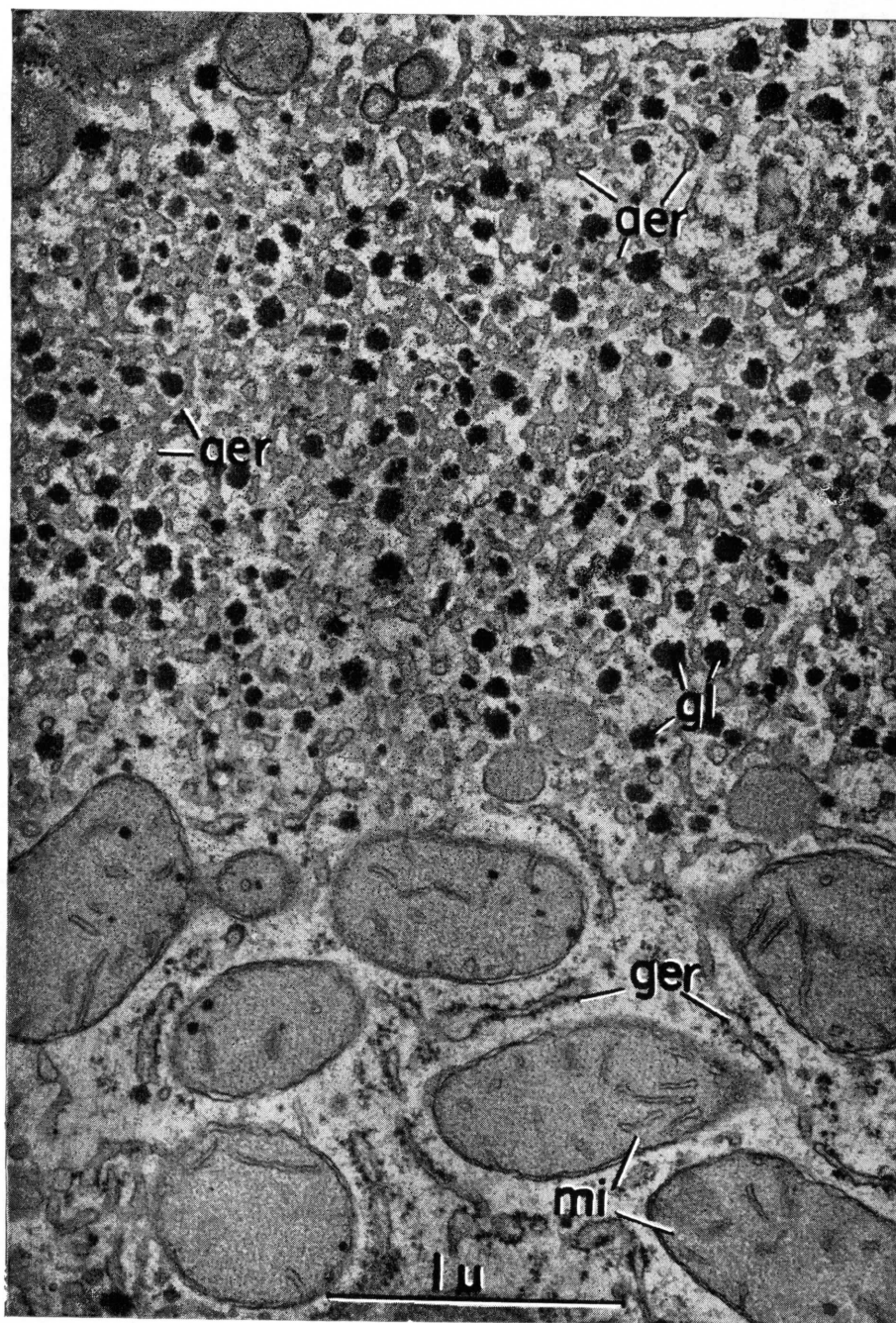


FIG. 10-8. *Fotomicrografía electrónica del citoplasma de una célula hepática.* En la parte inferior, el retículo endoplásmico granular (*ger*) y las mitocondrias (*mi*); en la parte superior el retículo endoplásmico agranular (*aer*) está mezclado con partículas de glucógeno (*gl*). 45,000 $\times$. (Cortesía de G. E. Palade.)

en las cuales se observa un material intracisternal denso. En el páncreas, se pueden distinguir gránulos intracisternales más pequeños que los de cimógeno.

La membrana del RE mide alrededor de 50 a 60 Å de espesor, y es por tanto notablemente más delgada que la membrana plasmática. A pesar de ello posee una estructura tipo "unidad de membrana", es decir, dos bandas densas separadas por una clara (figura 18-2). Se ha calculado que la superficie total del RE contenido en 1 ml de tejido he-

pático es de 11 m², siendo dos tercios de tipo granular (Werbel y colaboradores, 1969).

El origen del RE es aún incierto. Observaciones como las de la figura 10-1 sugieren su posible desarrollo por evaginación de la membrana nuclear. Más aún, en telofase, la membrana nuclear se regenera a partir del RE.²⁹ La identidad entre estos dos componentes del sistema vacuolar también es apoyada por estudios citoquímicos.³⁰ La relación entre el RE granular y el agranular puede ser estudiada en células de rápida diferencia-

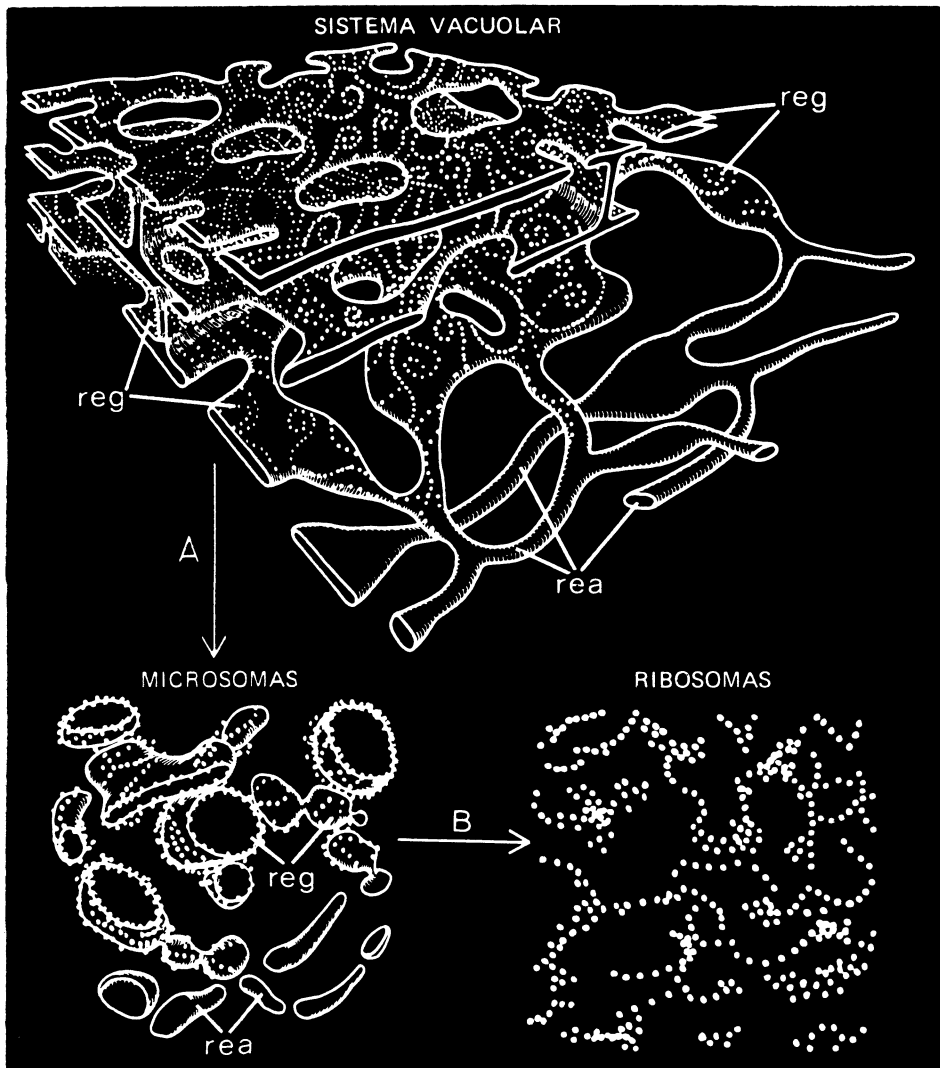


FIG. 10-9. Esquema del sistema vacuolar con el retículo endoplásmico granular (reg) y el agranular (rea). A, indica que mediante la homogeneización se producen microsomas, y B, que por la acción de un detergente las membranas se destruyen y los ribosomas quedan libres.

ción. En hepatocitos de rata, durante el período fetal aumenta preferentemente el tipo granular, mientras que después del nacimiento predomina el tipo agranular o liso.³¹ Inyectando leucina- C^{14} y glicerol- C^{14} , se demostró que en el período de rápido crecimiento del RE, la incorporación de esas sustancias a proteínas y lípidos es mayor en el tipo granular que en el agranular. Este hallazgo permite suponer que la síntesis de las membranas sigue la dirección RE granular $\rightarrow$ RE agranular.

Láminas anulares. La membrana nuclear será estudiada junto con el núcleo interfásico (véase capítulo 16). Se advertirá, entonces, que la diferencia estructural entre estos dos elementos del sistema vacuolar reside en los poros y anillos (complejo del poro) que posee la membrana nuclear. Éstos faltan generalmente en el RE, aunque es posible hallarlos en invertebrados y en espermatozoides y ovocitos de vertebrados.^{32, 33} La presencia de láminas anulares está generalmente asociada a rápidas proliferaciones, como es dado observar en células embrionarias o neoplásicas. En huevos de equinodermos y de anfibios se demostró el origen de estas láminas anulares por evaginación de la membrana nuclear y la existencia de ribosomas adheridos a ellas.^{34, 35}

Además, se han observado diafragmas que obturan los poros en ambas estructuras³⁶ y se describió una simetría octogonal como en los poros nucleares.³⁷

Microsomas

Después de la homogeneización de la célula, se pueden aislar por centrifugación las diferentes fracciones: nuclear, mitocondrias, microsómica y soluble (fig. 7-5). La membrana nuclear sedimenta junto con los núcleos, pero los otros componentes del sistema vacuolar, incluyendo el RE granular y el agranular más las membranas de Golgi, generalmente sedimenta formando la fracción microsómica. Como se mencionará luego, el complejo de Golgi puede también separarse como fracción definida. Las observaciones realizadas por medio de la microscopia electrónica en microsomas de hígado ponen de relieve fragmentos del sistema vacuolar con el aspecto de vesículas aisladas, túbulos y algunas cisternas con ribosomas adheridos.

En los microsomas del páncreas, el sistema vacuolar experimenta una fragmentación mayor y, en general, aparece como vesículas redondas rodeadas de partículas densas (figuras 10-9 y 10-10).³⁵

En conjunto, la fracción microsómica del páncreas es más homogénea que la del hígado y esto constituye un reflejo de las diferentes organizaciones del sistema vacuolar en

ambas células. Sin embargo, no existe duda alguna de que la fracción microsómica contiene, además del RE, membranas del complejo de Golgi, membranas plasmáticas rotas y otros fragmentos celulares.

Los microsomas representan alrededor del 15 al 20 por ciento de la masa total de la célula. Desde los primeros estudios se demostró que esa fracción contiene hasta el 50 o 60 por ciento del ARN celular y ahora se sabe que éste corresponde a los ribosomas.^{39, 40} Los microsomas tienen un alto contenido en lípidos, que incluyen a los fosfolípidos, inositol, acetilfosfátidos (plasmalógeno) y glangliósidos (véase cap. 4).

La complejidad de su composición química se refleja también en el gran número de enzimas microsómicas. Las primeras en ser identificadas fueron un grupo de esterasas y la NADH-citocromo-C-reductasa, que ha sido empleada con frecuencia para marcar las membranas microsómicas.^{38, 41} La función de este transportador de electrones, que contiene citocromo b_5 , es desconocida. También se encuentran presentes en las membranas microsómicas la NADH-diaforasa, la glucosa-6-fosfatasa y la ATPasa activada por Mg^{++} . Citoquímicamente, el RE hidroliza uridina-difosfato (UDP), guanidina-difosfato (GDP) e inosina-difosfato (IDP), y también pirofosfato de tiamina. Estudiando los microsomas durante la diferenciación celular del hepatocito de rata, puede demostrarse que tanto la glucosa-6-fosfatasa como la NADH-citocromo-C-reductasa aparecen primero en el retículo granular y luego son transferidas a la porción agranular.⁴²

TABLA 10-2. Algunas actividades enzimáticas de los microsomas

(De Rothschild, modificado ⁴³).

- Síntesis de glicéridos:
 - Triglicéridos.
 - Fosfátidos.
 - Glucolípidos y plasmalógenos.
- Metabolismo de plasmalógenos.
- Biosíntesis de esteroides:
 - Biosíntesis de colesterol.
 - Hidrogenación de esteroides de uniones no saturadas.
- Transformaciones de esteroides que requieren $DPNH_2 + O_2$:
 - Aromatización.
 - Hidroxilación.
- Detoxicación de drogas que requieren $DPNH_2 + O_2$:
 - Hidroxilaciones aromáticas.
 - Oxidaciones de cadenas laterales.
 - Desaminación.
 - Oxidación de radicales tioésteres.
 - Desulfuración.
- Síntesis del ácido L-ascórbico.
- Metabolismo del ácido L-ascórbico.
- Metabolismo del ácido UDP-urónico.
- Desfosforilación de la UDP-glucosa.
- Arilsulfatasa y sulfatasa esteroide.

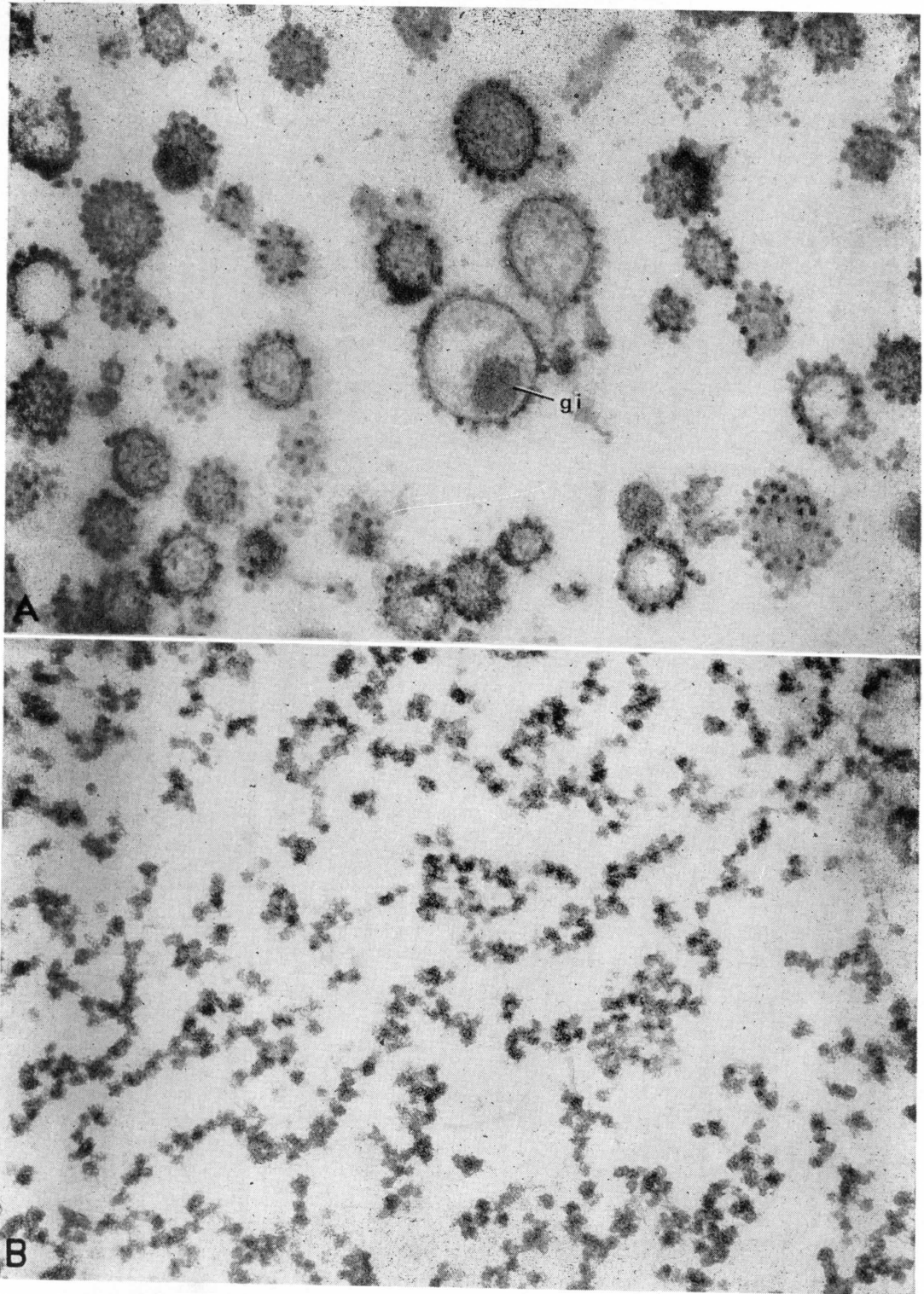


FIG. 10-10. A Microsomas de páncreas de cobayo. Se observan vesículas con ribosomas adheridos; *gi*, gránulo intracisternal. 80,000 $\times$. B Ribosomas aislados del páncreas después de la solubilización de las membranas. 110,000 $\times$. (Cortesía de G. E. Palade.)

La tabla 10-2 indica que los microsomas poseen diferentes funciones bioquímicas. a) Por medio del nucleótido-difosfato, intervienen en la biosíntesis de fosfátidos, ácidos ascórbico y glucurónico, y en el metabolismo de las hexosas; b) intervienen muy activamente en la biosíntesis de esteroides; c) están vinculados con una serie de reacciones que requieren NADH_2 y O_2 ; d) actúan en ciertos puntos de la síntesis de glicéridos, fosfolípidos, glucolípidos y plasmalógenos.⁴³

Subfraccionamiento de los microsomas. Análisis más profundos de la fracción microsómica implican la disociación de las membranas de los ribosomas.³⁸ El tratamiento con agentes tensioactivos como el desoxicolato, permitió la solubilización de las membranas y la separación de los ribosomas (véase cap. 18 y fig. 10-10).

En estos experimentos, las proteínas, fosfolípidos, hemocromógeno y la NADH -reductasa, que forman parte de la membrana, desaparecen con el aumento de la concentración de desoxicolato, mientras que el ARN permanece constante. Por medio de técnicas de centrifugación diferencial más perfeccionadas, que comprenden el empleo de gradientes discontinuos de densidades, la fracción microsómica puede ser aún subfraccionada en vesículas agranulares y vesículas granulares con los ribosomas adheridos.⁴³ Con esta técnica se han establecido algunas diferencias metabólicas entre estas dos porciones del RE. Se encuentran concentradas en el RE agranular diversas enzimas que metabolizan drogas como el fenobarbital, aminopirina, clorpromazina y codeína. En las células hepáticas, al seguir la incorporación de leucina- C^{14} en la seroalbúmina, se puede observar que ésta ingresa primero en el retículo granular y luego en el retículo agranular (fig. 10-11).⁴⁴ Ello se puede interpretar como un indicio de que la seroalbúmina se sintetiza antes en el retículo granular y que después es transferida al agranular.

Funciones del sistema vacuolar

Muchas interpretaciones funcionales se basan en los aspectos polimorfos del sistema vacuolar en diversas células y en diferentes etapas de su actividad. Por medio de los estudios de aislamiento ya mencionados se obtuvieron algunos resultados más positivos. La siguiente lista de posibles funciones no es completa de ningún modo y solamente incluye hechos bien conocidos, al lado de otros que están todavía en discusión.⁴⁵

Sostén mecánico. El sistema vacuolar, junto con la matriz citoplásmica, participa en muchas de las propiedades mecánicas de la célula. Al dividir el contenido líquido de ella en compartimientos, le proporciona un soporte mecánico suplementario para la estructura coloidal del citoplasma.

Intercambio. Las membranas del sistema vacuolar pueden regular el intercambio entre el compartimiento interno y el externo de la matriz citoplásmica.

Se sabe que en la célula el sistema posee *propiedades osmóticas*. Una vez aislados, los microsomas se comportan osmóticamente, expandiéndose o contrayéndose de acuerdo con la presión osmótica del líquido. A través de estas membranas puede haber difusión y un transporte activo, como en la membrana plasmática (véase cap. 21).

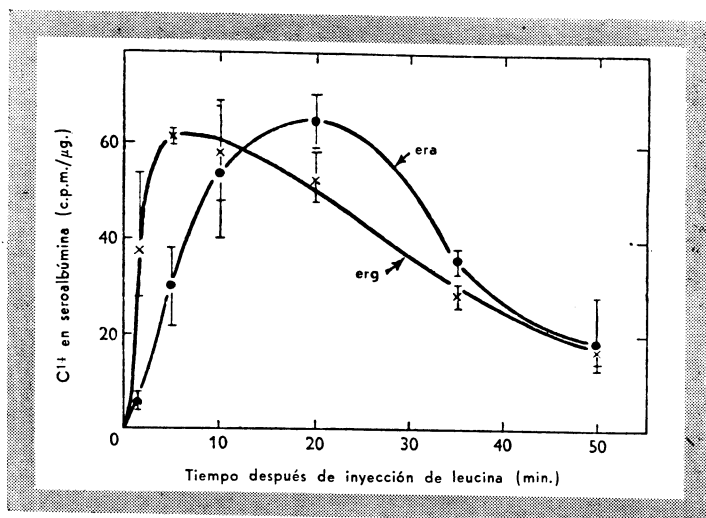


FIG. 10-11. Incorporación de seroalbúmina marcada con leucina -C^{14} en el RE granular (erg) y RE agranular (era). La incorporación, después de la inyección de leucina -C^{14} es más rápida en la primera. (De Peters.)

Propiedades enzimáticas. Hemos citado en párrafos anteriores las numerosas enzimas que están asociadas a las membranas del RE (tabla 10-2). Las membranas proporcionan una gran superficie interna que actúa en las diferentes reacciones metabólicas por medio de las enzimas adheridas. Éstas intervienen principalmente en el metabolismo de los esteroides y fosfolípidos.

Como ocurre en la membrana plasmática, se ha postulado la presencia de *transportadores* (carriers) y *permeasas* que pueden funcionar en el transporte activo a través de la membrana (véase cap. 21). De acuerdo con ciertas opiniones, la distribución de algunas enzimas indicaría una relación dinámica entre las diferentes porciones del sistema vacuolar en la siguiente dirección: RE granular $\rightarrow$ RE agranular $\rightarrow$ membrana de Golgi $\rightarrow$ secreción³⁰ (véanse cap. 21 y fig. 10-11).

Flujo de membranas y circulación. También se ha postulado la existencia de un flujo de membranas y de material con esclusas en ciertos puntos del sistema. En éste el RE actuaría como un tipo de *sistema circulatorio* en relación con el desplazamiento intracelular de diversas sustancias.²⁰ El flujo de membranas podría ser un mecanismo importante para acarrear partículas, moléculas o iones, tanto al interior como al exterior de las cé-

lulas por medio del sistema vacuolar.⁴⁶ Como se observa en el esquema de la figura 10-12, si existe una región AA', en la cual la membrana plasmática se está sintetizando activamente, y otra B, en la que se está destruyendo, tiene lugar un flujo de membranas en la dirección de la flecha. Por este mecanismo se pueden incorporar al interior del citoplasma las partículas adheridas a la superficie de la célula y también el medio líquido externo (fig. 10-12).

Un mecanismo semejante, pero trabajando en dirección opuesta (*f* a *a*), es susceptible de efectuar el transporte de una partícula del interior del citoplasma al medio exterior (por ejemplo, secreción: véase cap. 25). Las continuidades que se observan en algunos casos entre RE y las dos capas de la membrana nuclear sugieren que el flujo de membrana puede ser también activo en dicho lugar. Este flujo hipotético proporcionaría uno de los diversos mecanismos para transportar ARN y nucleoproteína del núcleo al citoplasma (véase cap. 17).

Acerca de este posible mecanismo de flujo de membranas, el lector hallará otros detalles, particularmente en las secciones de este libro concernientes a la pinocitosis, fagocitosis y secreción. El sistema vacuolar puede tener importantes actividades fisioló-

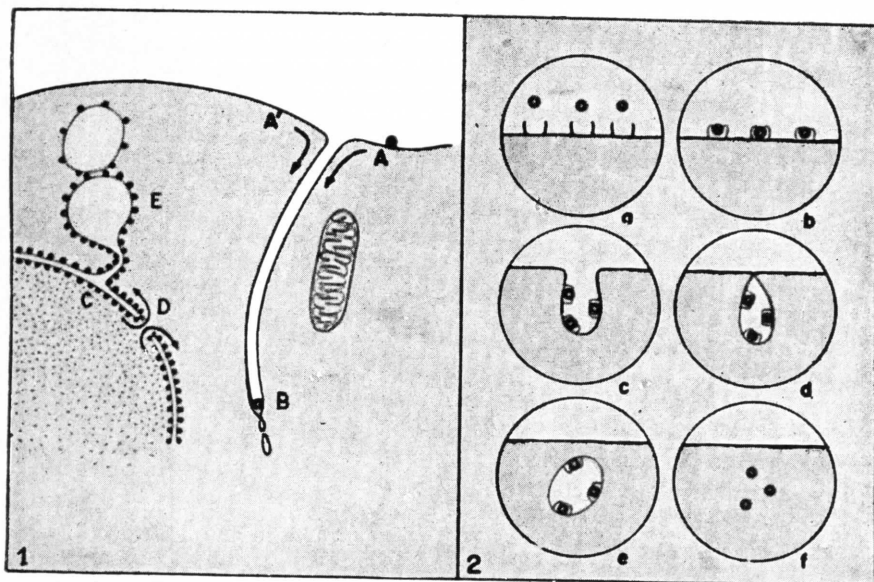


FIG. 10-12. 1 Esquema representativo de la hipótesis del flujo de membrana. 2 Esquema que evidencia el concepto de transporte por vesiculación de la membrana. (De H. S. Bennett, 1956.)

gicas en la célula, como permeabilidad, circulación de sustancias, síntesis y almacenamiento dentro de las membranas, secreción, etc. Otro concepto significativo es que a ese nivel de estructura, ciertos componentes celulares, por ejemplo, la membrana plasmática y la membrana del sistema vacuolar, son sumamente dinámicos. Pueden formarse y destruirse, acaso en forma continua, en el interior del citoplasma.

Síntesis proteica y segregación de productos. Como se mencionará en el capítulo 19, la síntesis proteica se produce en íntima relación con los ribosomas. La existencia del RE granular plantea el interrogante sobre el papel desempeñado por las membranas en este proceso. Es evidente que cuando las proteínas se sintetizan para ser incorporadas o empleadas por las células, como la hemoglobina, proteínas fibrosas, etc., las membranas del sistema vacuolar no están comprendidas y los productos son almacenados directamente en la matriz celular. El sistema vacuolar parece ser activo en aquellos procesos en los cuales la proteína se sintetiza para ser eliminada, como la síntesis de tropocolágeno, proteínas séricas, gránulos de secreción, etcétera. La disposición bidimensional de los polirribosomas sobre la superficie del RE suministra probablemente un medio mucho más rápido para el empleo de ARN mensajero en la síntesis proteica (véase cap. 19). Las moléculas que son dejadas en libertad por los ribosomas penetran en la cavidad del RE y son almacenadas y segregadas para su eliminación al exterior de la célula. En el caso de algunas proteínas séricas (en especial la γ -globulina) sintetizadas en las células plasmáticas, fue posible seguir el almacenamiento por medio de anticuerpos conjugados a la ferritina⁴⁷ o produciendo anticuerpos antienzimas (véase cap. 7).

Es interesante destacar que el transporte de material por el interior de las cavidades del RE es mucho más rápido que la síntesis de las membranas de este retículo. En el transporte interactúan tres tipos de membranas (RE $\rightarrow$ Golgi $\rightarrow$ membrana plasmática), las cuales se conectan y desconectan mediante fusión y fisión de sus componentes. La cinética de este sistema de transporte será estudiada en detalle en el capítulo 25, junto con el proceso de secreción celular (véase Palade, 1969).

Funciones del retículo endoplásmico agranular o liso

Lípidos. Mientras que el RE granular predomina en células con activa síntesis proteica, la variedad agranular es abundante en las que se hallan relacionadas con la síntesis de lípidos.⁴⁸ Se ha observado una correspondencia entre los elementos del sistema vacuolar y la síntesis de triglicéridos en la formación de complejos lipoproteicos. Esta actividad estaría asociada principalmente con el RE agranular y el complejo de Golgi.⁴⁹

Glucógeno. En animales en ayuno se ha encontrado que el glucógeno residual permanece asociado con los túbulos y vesículas del RE.⁵⁰ Al realimentarlo existe un aumento del RE agranular que mantiene su asociación con el glucógeno que se está acumulando. También en las células vegetales se produce un desarrollo del RE agranular a lo largo de la superficie donde se están formando las paredes de celulosa.⁵¹

Una tentativa de localizar la enzima UDPG-glucógeno-trasferasa⁵² (implicada directamente en la síntesis del glucógeno) por el agregado de uridina-difosfato-glucosa (UDPG) al glucógeno original, ha demostrado que esta enzima se encuentra unida más bien a la partícula de glucógeno que al componente membranoso.⁵³ Ello sugiere que el RE agranular está relacionado con la glucogenólisis, pero no con la glucogénesis.

En células hepáticas, justo antes del nacimiento, hay un aumento del glucógeno, que es seguido de su rápida reducción como consecuencia del aumento de la glucosa-6-fosfatasa. Esta disminución del glucógeno se acompaña de un aumento del RE agranular.^{54, 55}

De acuerdo con algunas opiniones, la salida de glucosa al exterior de la célula ocurriría a partir de los depósitos de glucógeno, por medio del RE agranular en donde se encuentra la glucosa-6-fosfatasa. Esta, por tanto, podría ser activa en el transporte de glucosa a través de la membrana. Por dicho mecanismo el RE puede estar relacionado con la secreción de glucosa al exterior y también con su protección de la acción de enzimas glucolíticas de la matriz citoplasmática, regulando de ese modo el camino metabólico de la glucosa en las células.^{17, 53}

Detoxificación. Cuando se administran drogas como el fenobarbital en grandes cantidades, el animal presenta, junto con el aumento de la actividad de las enzimas relacionadas con la detoxificación, una hipertrofia considerable del RE agranular.⁵⁶ Este mecanismo fundamental para la eliminación de sustancias tóxicas es usado también para las hormonas esteroideas endógenas o exógenas. Carcinógenos como el 3-metoxi-colantreno y el 3,4-benzopireno se cuentan entre los inductores más potentes de las *enzimas metabolizadoras de drogas*.⁵⁷ Ese efecto inductor implica la síntesis de proteínas y puede ser inhibida por la acción simultánea del antibiótico puromicina.⁵⁸

Conducción intracelular de impulsos. El hecho de que haya un sistema vacuolar que separa al citoplasma en dos compartimientos, posibilita la existencia de gradientes iónicos y potenciales eléctricos a través de las membranas intracelulares. Este concepto ha sido

aplicado en especial al retículo sarcoplásmico, una forma especializada del RE (principalmente agranular) que se encuentra en las fibras musculares estriadas y que en la actualidad se considera como un sistema de conducción intracelular.⁵⁹ Sobre la base de

algunos datos experimentales y de observaciones morfológicas, se ha postulado que el retículo sarcoplásmico podría transmitir excitaciones desde la membrana superficial hasta la parte profunda de la fibra muscular. En el capítulo 23 se hará un estudio

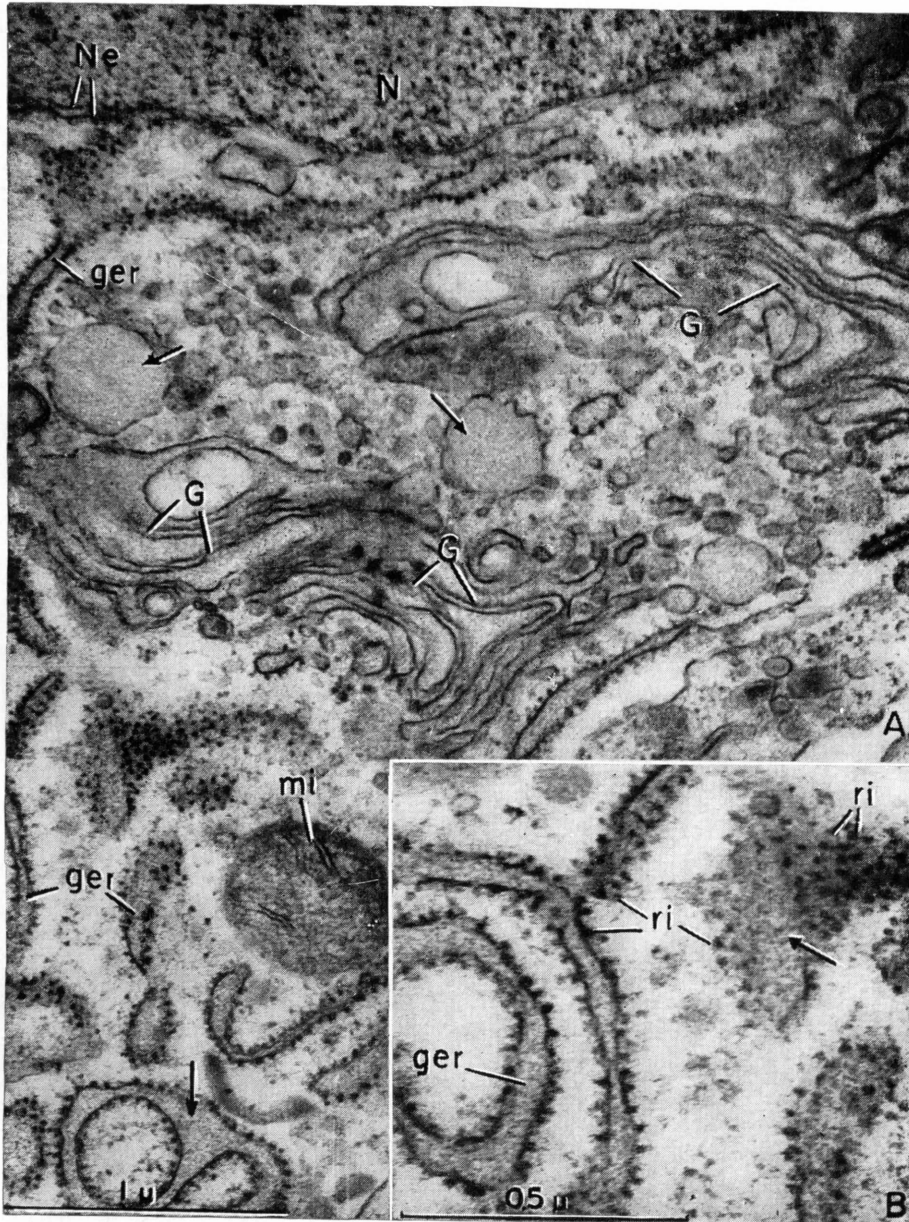


FIG. 10-13. Fotomicrografía electrónica de una célula plasmática. Cerca del núcleo (N) se observa un gran complejo de Golgi (G) constituido por pequeñas cisternas aplanadas y grandes vesículas. Algunas de las últimas (flechas) están llenas de material. Rodeando al complejo de Golgi existe un abundante retículo endoplásmico granular (ger) con las cisternas llenas de un material amorfo (flechas). ri, Ribosomas; mi, mitocondrias; Ne, membrana nuclear. 48,000 X. Recuadro a 100,000 X. (De E. De Robertis y A. Pellegrino de Iraldi.)

más detallado del retículo sarcoplásmico y de su posible función.

El complejo de Golgi

Al comienzo del capítulo se hizo una introducción histórica sobre este tema.

Las observaciones con el microscopio electrónico han demostrado que este complejo está constituido principalmente por membranas que pertenecen al sistema vacuolar de la célula. Una de las particularidades principales es su carencia de ribosomas. En efec-

to, el complejo de Golgi aparece rodeado de una zona, de la cual los ribosomas están aparentemente excluidos. Por esta razón no se observa síntesis proteica en el organoide.

Diferencian claramente al complejo de Golgi del RE diversas características importantes que se refieren a la localización y organización de las membranas del complejo de Golgi, así como ciertas propiedades químicas y bioquímicas.

El complejo de Golgi comprende los siguientes componentes morfológicos: 1) sacos aplanados o cisternas que en el corte apare-

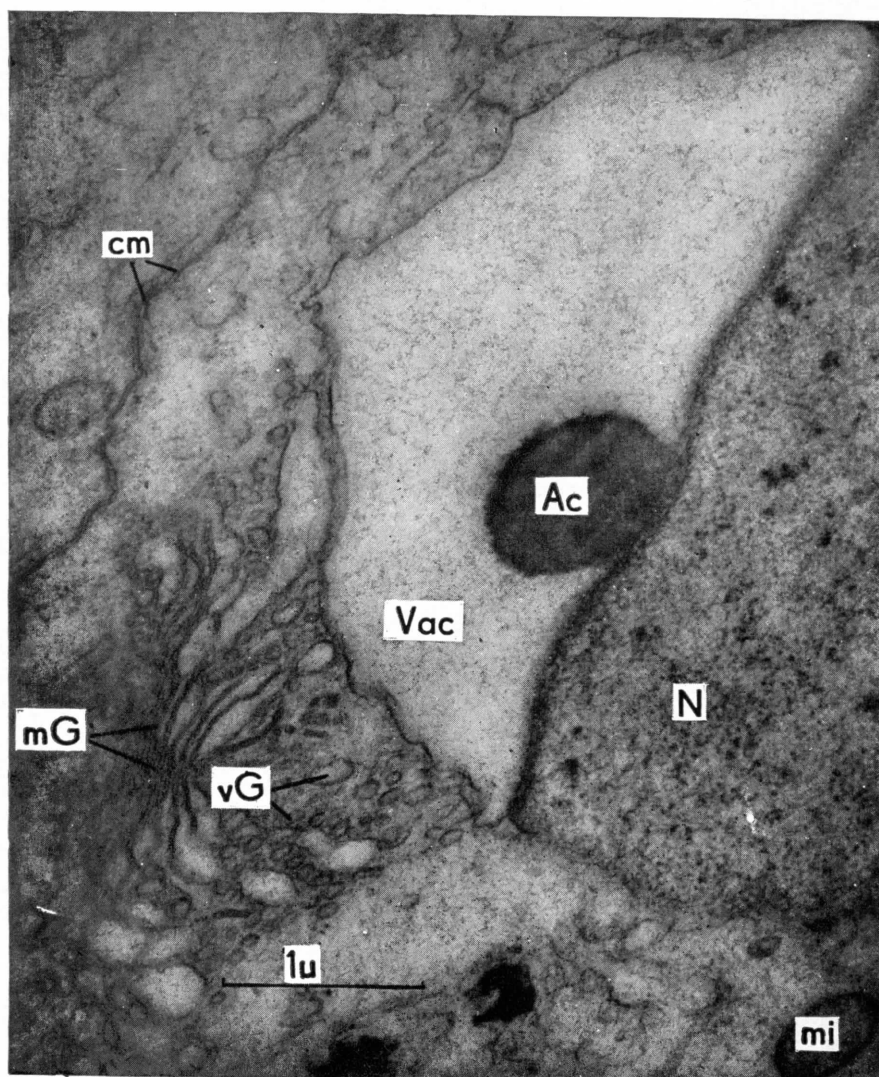


FIG. 10-14. Fotomicrografía electrónica de una espermátida de gato que evidencia el complejo de Golgi y su relación con la formación del acrosoma. mG, membranas de Golgi; vG, vacuolas de Golgi; Vac, vacuola acrosómica; Ac, acrosoma; N, núcleo; mi, mitocondria. (Cortesía de M. H. Burgos y D. W. Fawcett.)

cen como densas membranas paralelas (figs. 10-13 y 10-14); 2) acumulaciones de vesículas densas de unos 600 Å íntimamente asociadas con las cisternas; 3) grandes vacuolas claras que se encuentran en los bordes del complejo de Golgi. En algunas células estas vacuolas dilatadas pueden contener masas o gránulos densos.

Esto es particularmente evidente en el hígado, donde pueden verse partículas lipoproteicas dentro de las cavidades del Golgi. La acumulación de partículas aumenta notablemente con la administración de etanol a las ratas. Este tratamiento hace más lento el transporte de lipoproteínas (Palade, 1969).

El grupo de cisternas se dispone a menudo en forma concéntrica, encerrando regiones del citoplasma ocupadas por numerosas vesículas de gran tamaño.

En complejos de Golgi teñidos negativamente se ha descrito una placa fenestrada hacia la cual convergen estructuras tubulares (Morré, 1969). Ocasionalmente se observan elementos de transición, de tipo vesicular o tubular, que se conectan con el RE. Sin embargo, en algunas células esta conexión puede ser de tipo intermitente y estar relacionada con el transporte de material entre ambos compartimientos (véase cap. 25).

En general, las pilas de cisternas del complejo de Golgi están polarizadas de tal modo que por su polo proximal se asocian al RE o a la envoltura nuclear, mientras que por su polo distal lo hacen con la formación de vesículas secretoras. Asimismo, se ha observado un aumento en el espesor de las membranas de las cisternas, de manera tal que en la región proximal son más delgadas y morfológicamente más parecidas a las del RE. En cambio, en su polo distal, tanto por el espesor como por el aspecto se acercan a los de la membrana plasmática.^{21, 60, 61}

En las células vegetales y en los tejidos de invertebrados, el complejo de Golgi se encuentra disperso por todo el citoplasma en forma de cuerpos denominados *dictiosomas*, que están constituidos casi exclusivamente por sacos aplanados con grupos de pequeñas vesículas en el borde (fig. 12-4).

El espesor de las membranas es de unos 60 a 70 Å, el espacio entre los pares de membranas de 60 a 90 Å y el espacio que separa a los sacos varía entre 50 y 200 Å.^{21, 60, 61}

La *localización, tamaño y desarrollo* del complejo de Golgi difieren de un tipo celular a otro y también con el estado fisiológico

de la célula. La posición es relativamente fija. En células secretoras se halla polarizado y con frecuencia se dispone entre el núcleo y el polo apical (fig. 10-3).

La secreción celular y el complejo de Golgi

Los estudios realizados con el microscopio óptico demuestran que en esta región se pueden acumular diferentes sustancias absorbidas; por ejemplo, azul tripano, compuestos férricos o cúpricos, etc. Estos primeros resultados sugirieron que el complejo de Golgi actuaría como una membrana de condensación para "la concentración en gotas o gránulos de los productos elaborados en otros sitios y que se difunden en el citoplasma". Dichos productos pueden ser: lípidos, vitelo, componentes de la bilis, enzimas, hormonas, etc.⁶²

El microscopio electrónico ha aportado nuevos datos morfológicos con respecto a la relación entre el complejo de Golgi y la *secreción* que fuera postulada por Cajal, en 1914, en sus estudios sobre células caliciformes.⁵² En este tipo de células se ve que los sacos del complejo de Golgi están vinculados con las cisternas del RE y con los gránulos de secreción.

En las células plasmáticas (fig. 10-13), el complejo de Golgi ocupa una gran región cerca del núcleo, mientras que el RE granular lo rodea. Las pequeñas vesículas que se encuentran en el centro corresponden a la región de la centrosfera. Tanto en ésta como en otras células existe una relación topográfica entre el complejo de Golgi y los centríolos.

Un ejemplo particularmente interesante del complejo de Golgi es el que se presenta durante el desarrollo de las espermátidas de mamíferos,⁶⁴ donde desempeña un papel importante en la formación del acrosoma (figura 10-14). En los tres ejemplos mencionados es evidente la polaridad del complejo de Golgi. Una de las superficies ("cara formadora" o proximal) muestra sacos vacíos aplanados, mientras que la otra ("cara de maduración" o distal) se transforma en vesículas de diferentes tamaños. Como se mencionará en el capítulo 25, este organoide concentra los productos de secreción del RE granular, que le llegan en forma más diluida. La función de concentración puede ponerse de manifies-

to mediante radioautografía, tanto en el nivel óptico como en el electrónico.^{55, 66}

También en relación con dicha función, se ha sugerido la existencia de una homología entre el complejo de Golgi y la vacuola contráctil de animales inferiores y protozoarios, alrededor de la cual se encuentran dictiosomas típicos.^{54, 67}

Estudios citoquímicos

Además de servir como sitio "de empaquetamiento" de los productos de secreción y proveer de membrana limitante a los gránulos de cimógeno, las membranas del Golgi están vinculadas con la formación de los *lisosomas primarios*. Se ha observado que ciertas membranas del complejo de Golgi son las primeras en dar positiva la reacción de la fosfatasa ácida.⁶⁸ En el capítulo 21 se analizará esta relación con mayor detalle y se interpretará a los lisosomas primarios como un tipo especial de secreción.

La región de Golgi tiene una reacción PAS positiva y conforme a ciertas hipótesis, las glucoproteínas se formarían en el complejo de Golgi, trasladándose por medio de peque-

ñas vesículas hacia los lisosomas o hasta la superficie celular para constituir la cubierta celular (véase cap. 21). Si se usa glucosa- H^3 se demuestra que ésta se incorpora a las glucoproteínas del aparato de Golgi de células caliciformes.^{70, 71} En células de maíz en división, los polisacáridos marcados se incorporan a la placa celular.

La capacidad de reducir el tetróxido de osmio después de un tratamiento prolongado, uno de los métodos que se emplean para poner de manifiesto el complejo de Golgi con el microscopio óptico (fig. 10-3), ha podido también ser demostrada al nivel del microscopio electrónico.⁷²

Algunos estudios citoquímicos tienden a probar la especialización química de las diferentes membranas intracelulares y la existencia de una relación dinámica entre ellas. Esto es evidente, en especial, para las diversas fosfatasas. Por ejemplo, en células hepáticas la glucosa-6-fosfatasa se encuentra en el RE mientras que la nucleósido-difosfatasa se presenta en el complejo de Golgi (fig. 10-15).⁷³

En ciertas células de hepatoma, el RE es activo para los difosfatos de uridina, guanidina e inosina, mientras que el complejo de Golgi posee altos niveles de tiaminopirofosfatasa.³⁰ Se ha postulado la presencia de una ATPasa- Na^+K^+ activada en el com-

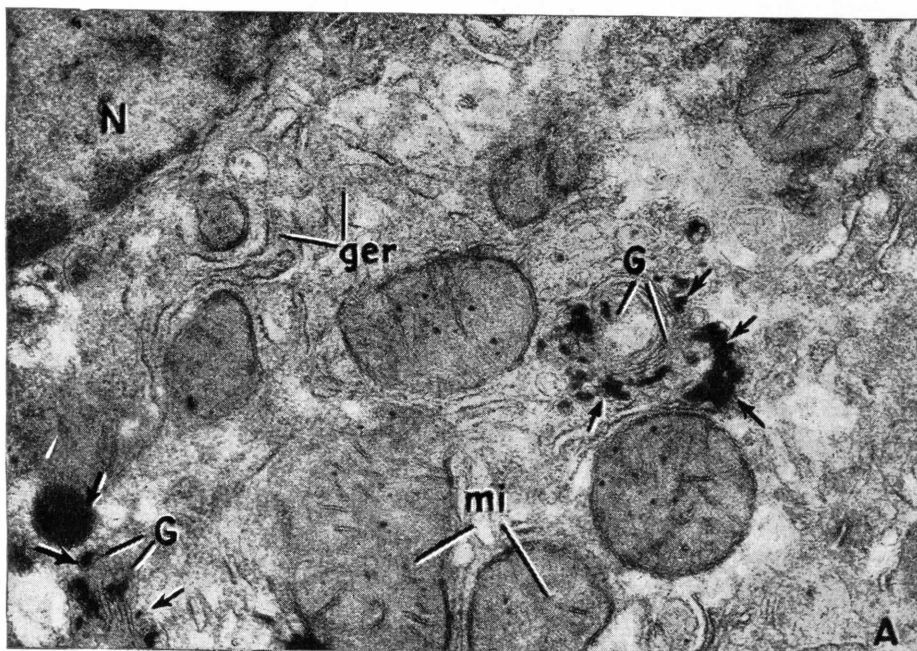


FIG. 10-15. Fotomicrografía electrónica de una célula hepática mostrando la actividad de la nucleósido-difosfatasa localizada en la zona de Golgi (flecha). Fijación en glutaraldehído e incubación en inosina-difosfato. N, núcleo; G, complejo de Golgi; mi, mitocondria; ger, retículo endoplásmico granular. 25,000 $\times$. (Cortesía de D. D. Sabatini, K. G. Bensch y R. J. Barnett.)

plejo de Golgi de neuronas, que se vacuoliza al inhibirse esta enzima.⁷⁴

De acuerdo con un punto de vista dinámico del sistema vacuolar, el RE granular puede dar lugar al RE agranular y a las membranas del Golgi, las que a su vez son susceptibles de constituir las membranas de las vacuolas secretoras. Estas transformaciones podrían indicar no sólo una diferenciación morfológica sino también citoquímica.

Aislamiento del complejo de Golgi. Estudios bioquímicos

Mientras que hasta hace poco tiempo el complejo de Golgi había sido aislado sólo de células del epidídimo,^{60, 75, 77} recientemente pudo lograrse su aislamiento de células del tallo de la cebolla,⁷⁸ del hígado de rata⁷⁹ y de muchos otros tipos celulares (Morré, 1969).

Sometiendo las células a una homogeneización suave, los componentes del Golgi no se desintegran, y pueden separarse mediante centrifugación a baja velocidad, seguida de otra en gradiente de sacarosa. Los complejos de Golgi tienen una densidad menor que el RE y las mitocondrias, y se equilibran en una banda de densidad 1,16. La microscopia elec-

trónica muestra cisternas apiladas rodeadas de un extenso sistema de túbulos y vesículas con productos de secreción⁸⁰ (fig. 10-16). El tratamiento de esta fracción con agua destilada permite purificarla aún más, al perderse el contenido de las vesículas.

Las membranas del Golgi tienen una composición lipoproteica que puede considerarse como intermedia entre la del RE y la membrana plasmática. Esto corrobora los datos morfológicos, apoyando el concepto de que el Golgi constituye una estructura intermedia susceptible de unirse a los otros dos sistemas de membranas en ciertos momentos del ciclo secretor (véase capítulo 25).

Algunas enzimas, como la ADPasa, la ATPasa-Mg⁺⁺ dependiente, la tiaminopirofosfatasa y la fosfatasa ácida, se concentran en la fracción del Golgi. La uridin-difosfonucleótido-N-acetilglucosamina-trasferasa, la galactosil-trasferasa y otras enzimas capaces de ligar grupos hidrocarbonados a las proteínas, están sumamente concentradas en esta fracción, mientras que, por el contrario, la glucosa-6-fosfatasa, un marcador del RE, se encuentra en bajas concentraciones.

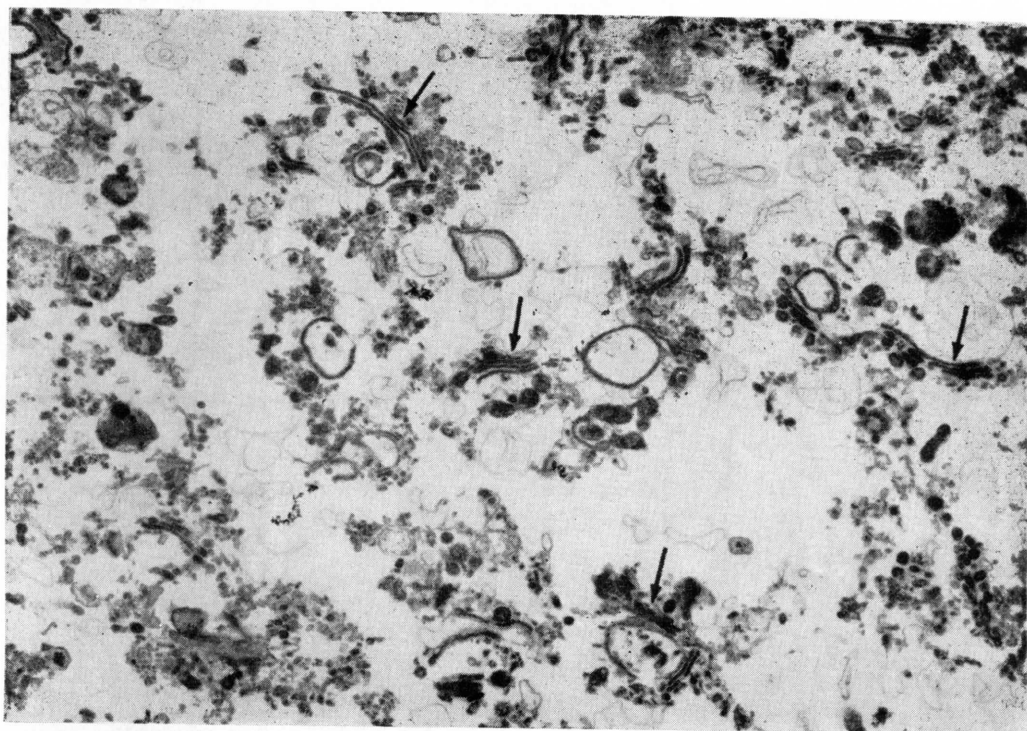


FIG. 10-16. *Complejos de Golgi, aislados del hígado. Con flechas se indican algunos en los que se observa la disposición paralela de las cisternas. (Cortesía de D. J. Morré.)*

Complejo de Golgi y secreción de glucoproteínas

La mayor parte de lo expuesto hasta aquí sugiere la participación del complejo de Golgi en la secreción celular y en la síntesis de hidratos de carbono. Esto es evidente en el caso de las células caliciformes, en las cuales puede comprobarse que 15 minutos después de la inyección de glucosa- H^3 , la radioactividad se localiza en las cisternas del Golgi.^{70, 71} Posteriormente aparece en los glóbulos de mucus, y a los 40 minutos se la halla únicamente en éstos. En tanto que las cisternas distales del Golgi se llenan de mucus, las proximales se forman cerca de la envoltura nuclear.

Estas y otras evidencias sugieren que los hidratos de carbono se sintetizan en el Golgi, a partir de azúcares más simples, para ser ligados a proteínas previamente sintetizadas por los ribosomas y transportadas por el RE hasta el complejo de Golgi. Éste participaría también en la adición de grupos sulfato a la porción hidrocarbonada de las glucoproteínas.

En las células cartilaginosas, no sólo se sintetizan estas últimas, sino también mucopolisacáridos. Para una revisión general de la relación entre el complejo de Golgi y el metabolismo de los hidratos de carbono (véase Neutra y Leblond, 1969).

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Haguenau, F.: (1958) The ergastoplasm; its history, ultrastructure and biochemistry. *Int. Rev. Cytol.*, 7:425.
- Hibbard, H.: (1945) Current status of our knowledge of the Golgi apparatus in the animal cell. *Quart. Rev. Biol.*, 20:1.
- Palade, G. E.: (1969) Functional interrelations of cytoplasmic organelle current concepts and outlook. *First Int. Symp. Cell Biol. and Cytopharmacol.*, Venice, July 7-11.
- Palay, S. L.: (1958) The morphology of secretion. In: *Frontiers in Cytology*. (Palay, S. L., ed.) Yale University Press, New Haven, Conn.
- Porter, K. R.: (1961) The ground substance; observations from electron microscopy. In: *The cell*, vol. 2, p. 621. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Movré, D. J.: (1969) Golgi apparatus function in membrane transformation and product compartmentalization: studies with cell fractions isolated from rat liver. *First Int. Symp. Cell Biology and Cytopharmacol.*, Venice, July 7-11.
- Neutra, M. and Leblond, C. P.: (1969) The Golgi apparatus. *Scient. Amer.*, 220:100.
- Weibel, E. R., Stäubli, W., Gnägi, R. and Hess, F. A.: (1969) *J. Cell Biol.*, 42:68.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Hirsch, C. G.: (1939) *Protoplasma Monogr.*, 18:1, 394.
- Hibbard, H.: (1945) *Quart. Rev. Biol.*, 20:1.
- Bourne, G.: (1951) Mitochondria and Golgi apparatus. In: *Cytology and cell physiology*. (Bourne, G., ed.) Oxford University Press, London.
- Palay, S. L.: (1958) The morphology of secretion. In: *Frontiers in cytology*. (Palay, S. L., ed.) Yale University Press, New Haven, Conn.
- Hillarp, N. A. and Olivecrona, H.: (1946) *Acta anat.*, 2:119.
- Monné, L.: (1948) *Adv. Enzymol.*, 8:1.
- Swann, M. M. and Michison, J. M.: (1953) *J. exp. Biol.*, 30:506.
- Crick, F. H. C. and Hughes, A. F. W.: (1950) *Exp. Cell Res.*, 1:37.
- Child, C. M.: (1941) *Patterns and problems of development*, p. 584. University of Chicago Press, Chicago.
- Heilbrunn, L. V.: (1956) *The dynamics of living protoplasm*. Academic Press, New York.
- Marsland, D. A.: (1942) Protoplasmic streaming in relation to gel structure in the cytoplasm. In: *Structure of protoplasm*. (Seifriz, W., ed.) Iowa State College Press, Ames, Iowa.
- Heilbrunn, L. V.: (1958) The viscosity of protoplasm. In: *Protoplasmatologia*, II, C, 1. (Heilbrunn, L. V. and Weber, F., eds.) Springer-Verlag, Vienna.
- Heilbrunn, L. V.: (1952) *An outline of general physiology*, 3rd ed.
- Chambers, R.: (1940) *J. roy. micr. Soc.*, 60:113.
- Chambers, R.: (1949) *Biol. Rev.*, 24:2346.
- Ries, E.: (1938) *Grundriss der Histophysiologie*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Siekevitz, P.: (1959) *Ciba Foundation symposium on the regulation of cell metabolism*, p. 17. (Wolstenholme, G. E. W. and O'Connor, C. M., eds.) J. & A. Churchill, London.
- Porter, K. R., Claude, A. and Fullman, E. F.: (1945) *J. exp. Med.*, 81:233.
- Palade, G. E.: (1956) *Henry Ford Hospital Int. Symposium*, p. 185-215.
- Palade, G. E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:85.
- Sjöstrand, F. S.: (1956) *Int. Rev. Cytol.*, 5:456.
- Haguenau, F.: (1958) *Int. Rev. Cytol.*, 7:425.
- Porter, K. R.: (1961) The ground substance, observations from electron microscopy. In: *The Cell*, vol. 2, p. 621. (Brachet, J. and Mirsky, A. E. eds.) Academic Press, New York.
- Fawcett, D. W. and Ito, S.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:135.
- Thiéry, J. P.: (1958) *Rev. Hémat.*, 13:61.
- Rose, G. G. and Pomerat, C. M.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 8:423.
- Christensen, A. K. and Fawcett, D. W.: (1960) *Anat. Rec.*, 136:333.
- Palade, G. E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:417.
- Barer, R., Joseph, S. and Meek, G. A.: (1959) *Exp. Cell Res.*, 18:179.
- Essner, E. and Novikoff, A.: (1962) *J. Cell Biol.*, 15:289.
- Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1966) *J. Cell Biol.*, 30:73.
- Afzelius, B. A.: (1955) *Exp. Cell Res.*, 8:147.

33. Swift, H.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2 suppl. 415.
34. Merriam, R. W.: (1959) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 5:117.
35. Kessel, R. G.: (1963) *J. Cell Biol.*, 139:88a.
36. Ward, R. T. and Ward, E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:139.
37. Maul, G.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:88a.
38. Palade, G. E. and Siekevitz, F.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:171.
39. Claude, A.: (1946) *J. exp. Med.*, 84:51.
40. Claude, A.: (1949) *Adv. Protein Chem.*, 5:423.
41. Ernster, L., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1962) *J. Cell Biol.*, 30:97.
42. Dallner, G. P., Siekevitz, F. and Palade, G. E.: (1966) *J. Cell Biol.*, 30:97.
43. Rothschild, J.: (1963) The isolation of microsomal membranes. In: The structure and junction of the membranes and surfaces of cells. *Biochem. Soc. Symp.*, 22:4. University Press, Cambridge.
44. Peters, T.: (1962) *J. biol. Chem.*, 237:1181.
45. De Duve, C.: (1962) Enzymes and drug activation. Ciba Foundation Symposium. Little Brown and Co., Boston.
46. Bennett, S.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:99.
47. Rifkind, R. A., Morgan, C. and Harvet, M. R.: (1962) The ferritin conjugated antibody technique. *Fifth Internat Congress for Electron Microscopy*. Academic Press, New York.
48. Christensen, A. K. and Fawcett, D. W.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 9:653.
49. Claude, A.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:25a.
50. Porter, K. R. and Bruni, C.: (1960) *Cancer Res.*, 19:997.
51. Porter, K. R. and Machado, R. D.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:167.
52. Leloir, L. F. and Cardini, C. E.: (1957) *J. amer. chem. Soc.*, 79:6340.
53. Luck, D. J. L.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10:195.
54. Peters, V., Kelly, G. and Dembitzen, H.: (1963) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 111:87.
55. Rosen, S. I.: *J. Cell Biol.*, 23:78A.
56. Jones, A. L. and Fawcett, D. W.: (1966) *J. Histochem. Cytochem.*, 14:215.
57. Conney, A. H., Schneidman, K., Jacobson, M. and Kuntzman, R.: (1965) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 123:98.
58. Conney, A. H. and Gillman, A. G.: (1963) *J. biol. Chem.*, 238:3682-160B.
59. Porter, K. R.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10:219.
60. Dalton, A. J. and Felix, M. D.: (1954) *Amer. J. Anat.*, 94:171.
61. Dalton, A. J.: (1961) Golgi apparatus and secretion granules. In: *The cell*, vol. 2, p. 603. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
62. Kirkman, H. and Severinghaus, A. E.: (1938) *Anat. Rec.*, 70:413; 71:557.
63. De Robertis, E. and Sabatini, D. D.: (1960) *Fed. Proc.*, 19:70.
64. Burgos, M. H. and Fawcett, D. W.: (1955) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1:4.
65. Whaley, W. G., Kephart, J. E. and Mollenhauer, H. H.: (1964) In: *Cellular membranes in development*, p. 141. (M. Locke, ed.) Academic Press, New York.
66. Caro, L. G.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10:37.
67. Gantenby, J. B., Dalton, A. J. and Felix, M. D.: (1955) *Nature*, 176:301.
68. Novikoff, A. B., Essner, E. and Quintana, N.: (1964) *Fed. Proc.*, 23:1010.
69. Rambourg, G.: (1966) *Anat. Rec.*, 154:41.
70. Neutra, M. and Leblond, C.: (1966) *J. Cell Biol.*, 30:119.
71. Leffingwell, T. P.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:79a.
72. Dalton, A. J. and Felix, M. D.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:79.
73. Sabatini, D. D., Bensch, K. G. and Barnett, R. J.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:19.
74. Whetsell, W. O. and Bunge, R. P.: (1968) *J. Cell Biol.*, 59:141a.
75. Schneider, W. C., Dalton, A. J., Kuff, E. L. and Felix, M. D.: (1953) *Nature*, 172:161.
76. Kuff, E. L. and Dalton, A. J.: (1959) Biochemical studies of isolated Golgi membranes. In: *Subcellular particles*, p. 114. (Hayashi, T., ed.) The Ronald Press Co., New York.
77. Schneider, W. C. and Kuff, E. L.: (1954) *Amer. J. Anat.*, 94:209.
78. Cunningham, W. P., Morré, D. J. and Mollenhauer, H. H.: (1966) *J. Cell Biol.*, 28:169.
79. James Morré, D., Cheetham, R. and Junghans, W.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:96a.
80. James Morré, D., Mollenhauer, H. H., Hamilton, R. L., Mahley, R. W. and Cunningham, W. P.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:157a.

11

Mitocondrias. Estructura y función

Las mitocondrias (del griego: *hilo* y *gránulo*) son organoides granulares o filamentosos que se encuentran de manera constante en el citoplasma de protozoarios y de células animales y vegetales, y que se caracterizan por una serie de propiedades morfológicas, bioquímicas y funcionales. Entre éstas se hallan: a) forma y tamaño, visibilidad *in vivo* y propiedades tintoriales especiales; b) organización estructural específica; c) composición lipoproteica, y d) contenido de una gran batería de enzimas y coenzimas que trabajan de manera integrada para producir transformaciones energéticas celulares. Desde el punto de vista fisiológico, se puede considerar a las mitocondrias como verdaderas máquinas bioquímicas por medio de las cuales la energía contenida en las sustancias alimenticias se recupera a través del ciclo del ácido cítrico o de Krebs y de la cadena respiratoria y se convierte por fosforilación en la unión fosfato de alta energía del adenosintrifosfato (ATP; véase cap. 5). Por tanto, las mitocondrias son verdaderas plantas energéticas que producen la energía necesaria para que la célula lleve a cabo sus múltiples funciones (fig. 11-1).

Observadas primeramente a fines del siglo pasado y descritas como "bioblastos" por Altmann (1894), fueron denominadas mitocondrias por Benda (1897). Michaelis en 1900 logró colorearlas con verde Jano.

Posteriormente Lewis y Lewis (1914) hicieron observaciones sobre mitocondrias en células de cultivo de tejido, y demostraron su sensibilidad en diversas condiciones metabólicas. Bensley y Hoerr, en 1934, consiguieron aislar por primera vez mitocondrias hepáticas, lo cual hizo posible el estudio directo por métodos bioquímicos. La demostración final del papel de las mitocondrias en la respiración celular fue realizada por Hogeboom y

colaboradores en 1948.¹ En años recientes se han hecho avances importantes en el estudio de la ultraestructura de este organoide mediante el uso del microscopio electrónico, apareciendo la mitocondria como uno de los mejores ejemplos de integración morfológica y funcional de toda la célula.^{2,3} Últimamente ha sido demostrada la presencia de un ADN específico dentro de las mitocondrias, de constitución distinta al del núcleo; se ha descubierto que poseen una maquinaria de síntesis proteica propia y que, por ende, podrían participar en los mecanismos de herencia y diferenciación.

OBSERVACIONES EN CÉLULAS VIVIENTES

Aunque el examen de las mitocondrias en las células vivientes ofrece ciertas dificultades debido a su bajo índice de refracción, pueden observarse fácilmente en células cultivadas *in vitro*, en especial en campo oscuro y con contraste de fase.

El examen vital y supravital se facilita mediante la coloración con solución diluida de *verde Jano*, con la cual las mitocondrias toman un color azul verdoso. Esta coloración se debe al sistema de la citocromooxidasa presente en las mitocondrias que mantiene al colorante en su forma oxidada (coloreada). En cambio, en el citoplasma que las rodea, el colorante es reducido a su leucobase incolora.

Se ha podido demostrar con micromanipulación que las mitocondrias son relativamente estables y que pueden desplazarse por medio de microagujas sin sufrir alteraciones. El *peso específico* es mayor que el del citoplasma. Por medio de la ultracentrifugación de células sometidas a campos de 200.000 a 400.000 veces la gravedad, las mitocondrias se depo-

sitan en el polo centrífugo manteniendo intactas su forma y estructura.

Cambios en el volumen y forma in vivo

La observación vital es de particular interés cuando se la complementa con cinematografía. Se pueden observar en fibroblastos cultivados cambios continuos (a veces rítmicos) en el volumen, forma y distribución de las mitocondrias. Existen dos tipos principales de *movimiento*, uno de agitación y el otro de desplazamiento de una parte a otra de la célula. Los movimientos son más activos en la interfase que durante la mitosis. En ocasiones las mitocondrias se hallan adheridas a la membrana nuclear en un lugar cercano al nucléolo^{4, 5} e, incluso, las mitocondrias filamentosas pueden fragmentarse en gránulos y éstos a su vez volverse a unir. Algunos de esos movimientos son pasivos y se deben a la corriente citoplásmica.

Los cambios activos en volumen y forma de las mitocondrias provienen de factores químicos, osmóticos y mecanoquímicos. En células vivientes se observaron ciclos de *contracción de baja amplitud* relacionados con la fosforilación oxidativa. Se sabe que el cianuro, dinitrofenol y otros inhibidores oxidativos ocasionan hinchamiento y que el ATP en exceso contrae las mitocondrias. También puede producirse hinchazón o contracción de las mitocondrias por cambio de la presión osmótica del medio. Los fosfatos inorgánicos, glutatión reducido, Ca^{++} y los ácidos grasos favorecen el hinchamiento, mientras que el ATP

lo previene. En otro párrafo se verá que la contracción depende de una proteína contráctil presente en las mitocondrias y que posee propiedades similares a la actomiosina del músculo. Se pueden inducir *cambios de mayor amplitud* en el volumen de las mitocondrias por múltiples factores, entre los que se destacan el efecto del Ca^{++} y la tiroxina, que causan hinchamiento. El efecto fisiológico de la hormona tiroidea en el hipertiroidismo puede que se deba a su acción sobre las mitocondrias que producen el desacoplamiento entre la oxidación y fosforilación (véase más adelante). Otras hormonas, incluyendo el factor de crecimiento, la ocitocina, vasopresina e insulina y ciertos corticosteroides son susceptibles de actuar sobre el hinchamiento mitocondrial.³ Este también ocurre en condiciones patológicas como las que tienen lugar por la acción de carcinógenos, toxinas, etcétera. La propiedad de dilatarse y contraerse se estudia mejor después del aislamiento de estos orgánulos y será considerado junto con la fisiología de las mitocondrias.

MORFOLOGÍA

Puesto que las mitocondrias son estructuras extremadamente lábiles, se desintegran con rapidez por la acción de los fijadores. Debido a ello, todos los métodos de fijación se basan en la estabilización de la estructura lipoproteica por la acción prolongada de agentes oxidantes, como el tetróxido de osmio, ácido crómico y bicromato de potasio. Como coloración, se emplea generalmente la hematoxilina férrica (Regaud) o la fucsina ácida (Altmann). En el capítulo 7 se mencionaron algunas de las coloraciones citoquímicas para las mitocondrias (fig. 7-11).

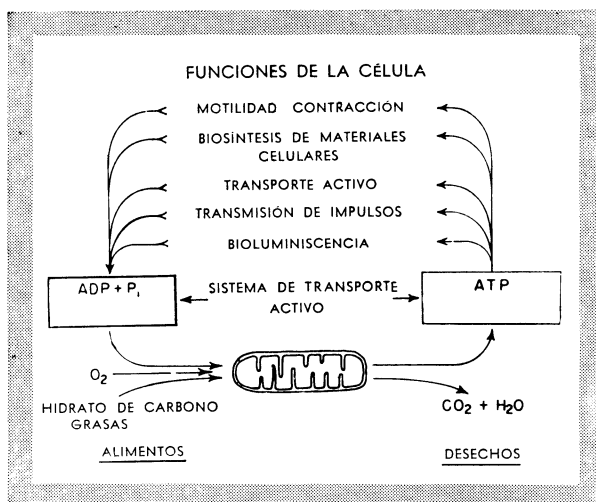


FIG. 11-1. Esquema que muestra a la mitocondria como la planta energética central de la célula. El adenosintrifosfato (ATP) producido se emplea en las diferentes funciones indicadas. (De A. L. Lehninger.)

Estos estudios citoquímicos también se han llevado a cabo en el nivel del microscopio electrónico, observándose que los productos de las reacciones se encontraban en íntima asociación con las crestas mitocondriales (véase más adelante).

La *forma* de las mitocondrias es variable, pero en general son *filamentosas* o *granulosas* (fig. 11-2). Durante ciertos estadios funcionales pueden verse otras formas derivadas de las anteriores. En el hígado, se han descrito ciclos morfológicos relacionados con la nutrición. En células hepáticas de peces, pocas horas después de la ingestión de alimentos, las mitocondrias filamentosas adoptan forma de clava, de raqueta o de vesícula. Trascorridas 48 horas, estos cambios terminan y se recupera el aspecto original.

El *tamaño* de las mitocondrias es también variable. En la mayoría de las células el ancho permanece relativamente constante (alrededor de $0.5\ \mu$) y la longitud variable puede llegar a un máximo de $7\ \mu$. Sin embargo, es posible encontrar bastones muy finos ($0.2\ \mu$) o más gruesos ($2\ \mu$), de acuerdo con el estado funcional de la célula. El tamaño y la forma

de las mitocondrias fijadas también dependen de la presión osmótica y del pH del fijador. A pH ácido tienden a fragmentarse y volverse vesiculosas. Se ha demostrado la importancia de emplear fijadores a un pH fisiológico.

En la tabla 11-1 se indican datos cuantitativos referentes a las mitocondrias hepáticas determinados por microscopía electrónica.⁶

TABLA 11-1. Mediciones de mitocondrias del hígado de rata

(De A. V. Loud⁶)

	Células periféricas	Células de la zona media	Células centrales
Por ciento de volumen citoplásmico	19.8	19.2	12.9
Número por célula ..	1060	1300	1600
Diámetro en micrones	0.56	0.47	0.32
Longitud en micrones	3.85	4.32	5.04
Volumen en micrones cúbicos	0.95	0.75	0.41

La *localización* de las mitocondrias es por lo común uniforme, pero existen muchas ex-

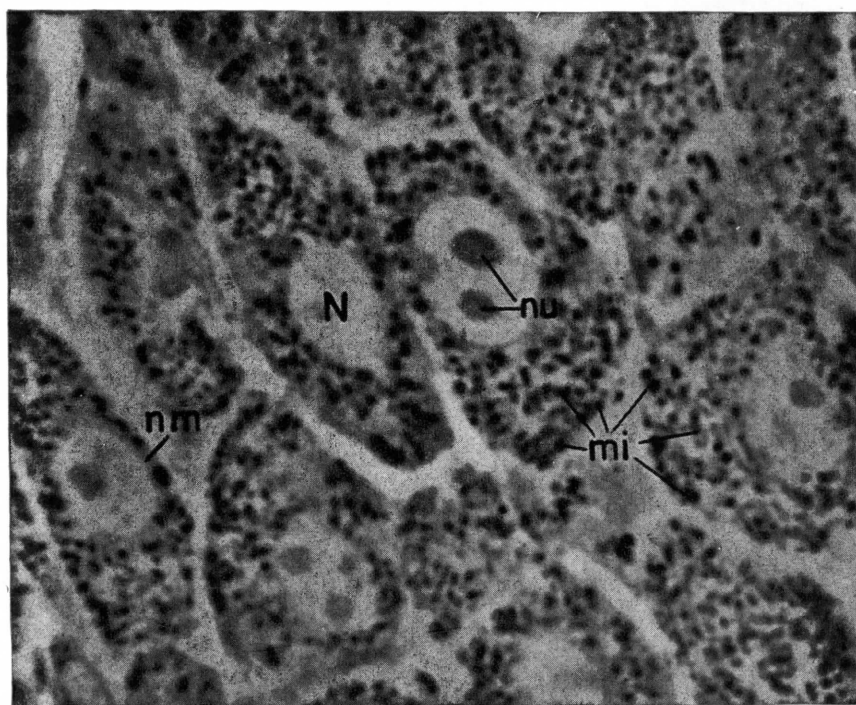


FIG. 11-2. Células hepáticas de rata, fijadas a -180°C y deshidratadas en acetona a -40°C . Observación con contraste de fase en un medio de $n = 1.460$. N, Núcleo; nu, nucléolo; mi, mitocondria; nm, membrana nuclear. (Cortesía de S. Koulsh.)

cepciones a esta regla. En ciertos casos, se acumulan preferentemente alrededor del núcleo o en el citoplasma periférico. Tales distribuciones son más frecuentes en condiciones patológicas. Algunos de estos cambios dependen también de la sobrecarga con inclusiones de glucógeno o lípidos que desplazan a los organoides. Durante la mitosis, las mitocondrias se concentran cerca del huso, y al dividirse la célula, se distribuyen en cantidad aproximadamente igual entre las células hijas (figura 13-4).

La *distribución* de las mitocondrias en el citoplasma debe ser considerada en relación con su función de provisión de energía. En algunas células se mueven libremente transportando el ATP donde se necesita, pero en otras tienen una localización constante cerca de la región de las células donde presumiblemente la energía es más necesaria. Así, en ciertas células musculares (por ejemplo, diafragma), se disponen a modo de anillo o cinturón alrededor de las miofibrillas. En los conos y bastones de la retina, todas las mitocondrias pueden estar localizadas en una porción del segmento interno. Las mitocondrias basales de los túbulos renales se hallan en íntima relación con los pliegues de la membrana plasmática presentes en esa parte de la célula, presumiéndose que ello está vinculado con el suministro de energía para el transporte activo de agua y sustancias en solución.

La *orientación* de las mitocondrias puede ser relativamente definida. Así, en células cilíndricas se orientan por lo común en la dirección basoapical, paralelas al eje principal. En los leucocitos se disponen más o menos radialmente respecto de los centriolos. Se ha sugerido que estas orientaciones dependen de la dirección de las corrientes de difusión dentro de la célula y que estarían relacionadas con la organización submicroscópica de la matriz citoplásmica y del sistema vacuolar.

Cierto número de mitocondrias se encuentra en el citoplasma de las células de respiración aerobia, con excepción de las bacterias que poseen sus enzimas respiratorias en la membrana celular (fig. 1-3).

La *cantidad* de mitocondrias es difícil de establecer, pero en general varía con el tipo celular y el estado funcional. En el hígado se ha estimado que representan del 30 al 35 por ciento del contenido proteico total de la célula y en el riñón el 20 por ciento. En el tejido linfático esas cifras son mucho menores. En el hígado de ratón homogeneizado existen

alrededor de 8.7×10^{10} mitocondrias por gramo de tejido fresco.⁷ En un hígado normal hay aproximadamente de 1000 a 1600 mitocondrias por célula, pero dicho número disminuye durante la regeneración y también en el tejido canceroso.^{8,9} Esta última observación podría estar relacionada con la disminución de las oxidaciones y el aumento de la glucólisis anaerobia en el cáncer.

Algunos ovocitos contienen un número elevadísimo de mitocondrias (hasta 300.000). En las plantas verdes son más escasas que en las células animales y los cloroplastos llevan a cabo algunas de sus funciones.

En síntesis, la morfología de las mitocondrias varía de una célula a otra, pero es más o menos constante en células de tipo similar o que poseen la misma función.

ESTRUCTURA MITOCONDRIAL

Los primeros estudios de mitocondrias realizados con microscopía electrónica en cortes finos revelaron que, por debajo de la estructura aparentemente homogénea observada con el microscopio óptico (fig. 11-2), existe una organización membranosa sumamente compleja.¹⁰

Como lo indica el esquema de la figura 11-3, la estructura básica de la mitocondria consiste en dos membranas y dos compartimientos, el mayor de los cuales representa la *matriz mitocondrial*. La mitocondria está rodeada de una membrana limitante externa (*om*) de alrededor de 60 Å, relacionada probablemente con las propiedades de permeabilidad del organoide. Dentro de ella y separada por un espacio de alrededor de 60 a 80 Å existe una membrana interna que envía hacia el interior de la cavidad mitocondrial pliegues complejos denominados *crestas mitocondriales*. La membrana interna, que es también de 60 Å de espesor, divide a la mitocondria en dos cámaras o espacios: 1) la *cámara interna*, contenida entre las dos membranas y en el centro de las crestas, y 2) la *cámara externa*, rodeada de la membrana interna. Esta última se halla ocupada por un material relativamente denso, que comúnmente se denomina *matriz mitocondrial*. Por lo general se aprecia como una sustancia homogénea, pero en algunos casos puede mostrar un material finamente filamentosos¹¹ o pequeños gránulos de alta densidad (Fig. 11-3), los cuales se consideran como sitios de unión para cationes bivalentes, en especial Mg y Ca.¹² Las crestas mito-

condriales que se proyectan a partir de la membrana interna son tabiques incompletos o puentes que no interrumpen la continuidad de la cámara interna y de este modo la matriz es continua en el interior de la mitocondria.

Estudios posteriores han demostrado que las membranas mitocondriales pueden ser más

complejas, con dos capas externas de mayor opacidad electrónica y una capa más clara en el medio. Esta estructura corresponde a la unidad de membrana mencionada en el capítulo 9 (fig. 11-4). Como en el caso de la membrana plasmática (véase capítulo 9), después de la extracción de la mayor parte de los

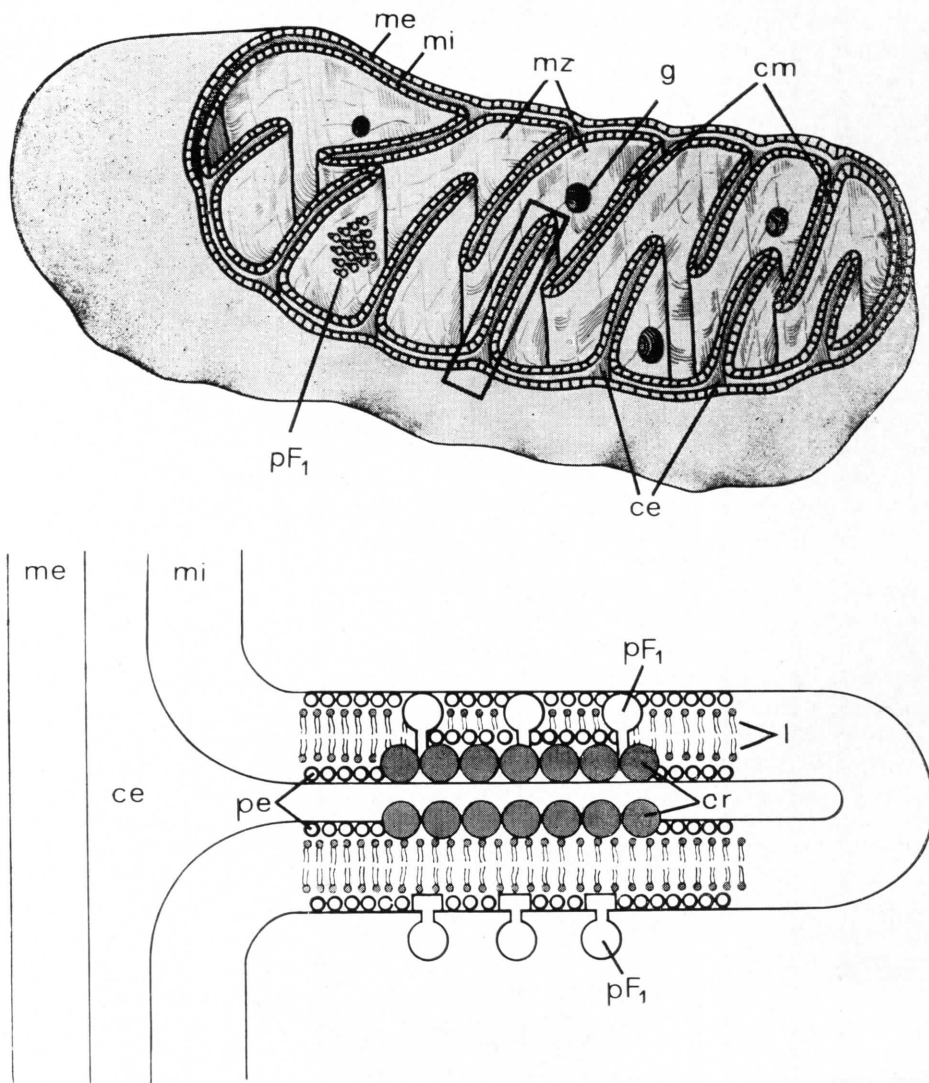


FIG. 11-3. Arriba. *Esquema tridimensional de una mitocondria*. Obsérvense: la membrana externa (*me*), la interna (*mi*), la matriz mitocondrial (*mz*), las crestas mitocondriales (*cm*) y los gránulos (*g*) presentes en la matriz, que contienen Ca^{++} y Mg^{++} . La cámara externa (*ce*) entre las membranas y las partículas F_1 (pF_1) también se indican (original). Abajo. *Organización molecular de una cresta mitocondrial* (correspondiente a la porción marcada en el diafragma superior). Véanse las cadenas respiratorias (*cr*) dispuestas en el borde externo de la membrana. En la mitocondria intacta, la posición de las pF_1 es probablemente la indicada en la parte superior de la cresta. Las pF_1 se expondrían con el tratamiento osmótico y la coloración negativa (véase fig. 11-5). (El esquema de abajo es cortesía de A. L. Lehninger.)

lípidos la estructura de la unidad de membrana permanece intacta.¹³

Mientras que las membranas internas y externas pueden ser consideradas como capas moleculares sólidas con una estructura compacta, la matriz es una fase más líquida que contiene proteínas solubles y moléculas más

pequeñas. Esta estructura doble (sólida-líquida) es importante para explicar algunas de las propiedades mecánicas de las mitocondrias, como la deformación e hinchamiento en condiciones fisiológicas o experimentales.

El empleo de coloraciones negativas facilitó el reconocimiento de otros detalles estruc-

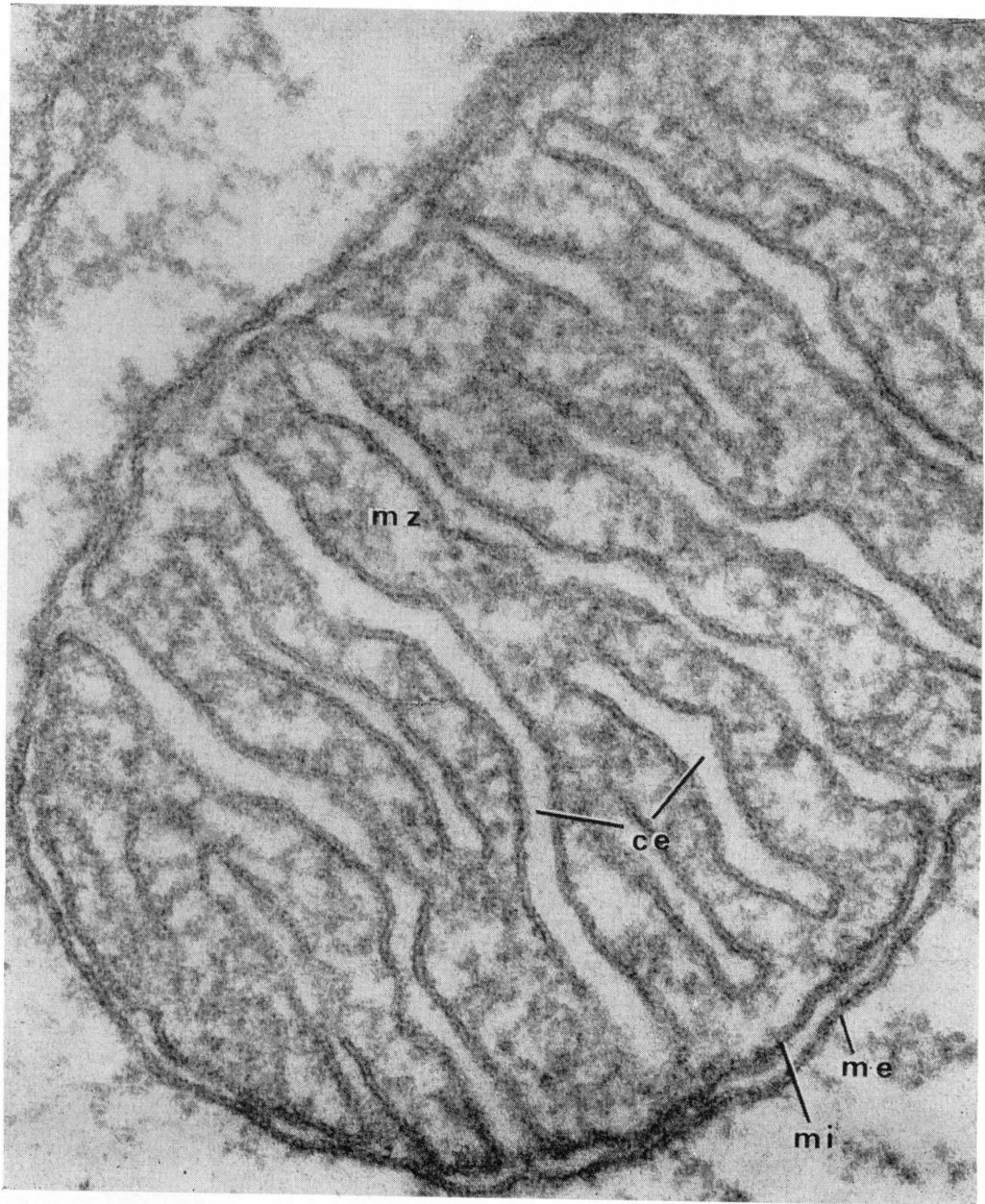


FIG. 11-4. Fotomicrografía electrónica de la mitocondria de una célula centroacinar del páncreas. Se observa la "unidad de membrana", tanto en la membrana externa (*me*) como en la interna (*mi*). *ce*, cámara externa; *mz*, matriz. 200,000 $\times$. (Cortesía de G. E. Palade.)

turales. Si se permite a una mitocondria dilatarse en una solución hipotónica y luego se la sumerge en fosfotungstato, la membrana interna y las crestas aparecen cubiertas de partículas de 80 a 100 Å, las cuales poseen un tallo que las une a la membrana (fig 11-5). Estas partículas, denominadas “elementales” o F_1 ,¹⁴ están esparcidas regularmente a intervalos de 100 Å sobre la superficie interna de las membranas. De acuerdo con algunos cálculos, existirían entre 10^4 y 10^5 partículas elementales por mitocondria.¹⁴

Como se mencionará más adelante, dichas partículas representan una ATPasa especial (o ATP-sintetasa) que hace de nexo entre la

fosforilación y la oxidación.¹⁵ En la mitocondria intacta se hallan contenidas en el espesor de la membrana interna y no se observan en los cortes; sólo cuando las mitocondrias son sometidas a tratamiento hipotónico y coloración negativa sobresalen de la superficie y se hacen visibles (fig. 11-3).

Variaciones de la estructura mitocondrial

La descripción precedente es, en términos generales, válida para diferentes tipos celulares y sirve para la identificación de las mitocondrias en la mayoría de las células. Estamos en presencia, por tanto, de un patrón común de estructura que se desarrolló

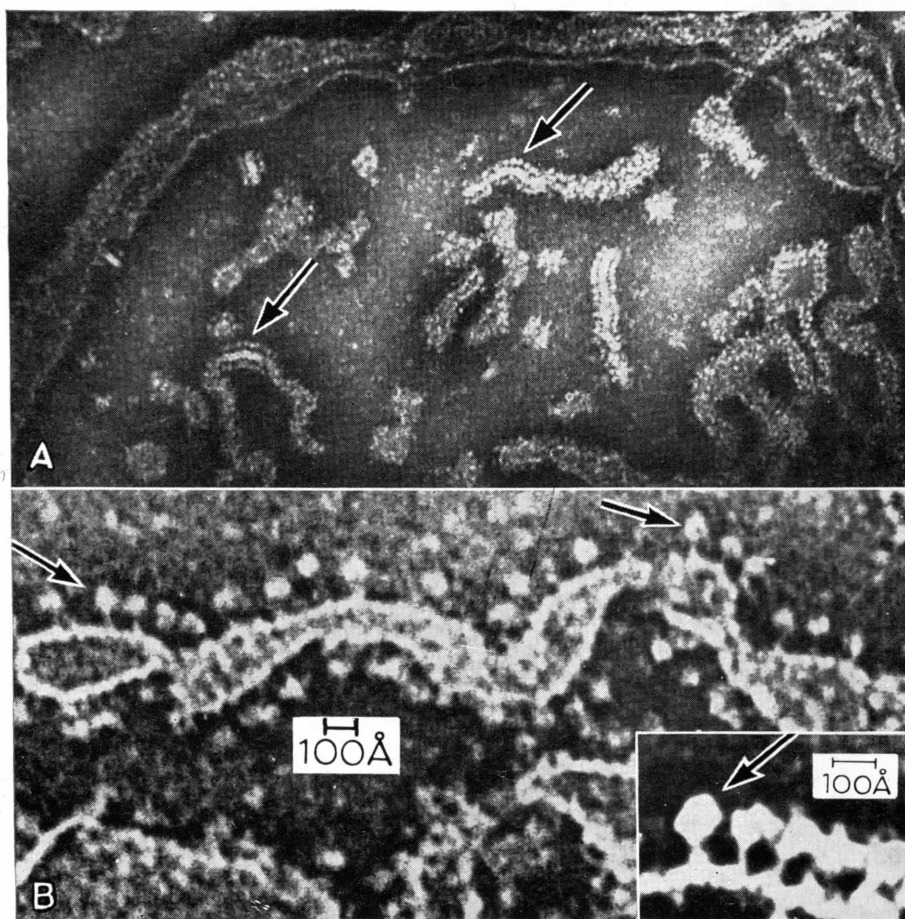


FIG. 11-5. Fotomicrografías electrónicas de mitocondrias hinchadas en solución hipotónica y coloreadas negativamente con fosfotungstato. A Con bajo aumento se observan crestas aisladas en medio de la matriz hinchada. Las flechas indican algunas de estas crestas. B Con mayor aumento ($500,000\times$) se aprecia una cresta mitocondrial con las denominadas partículas “elementales” sobre la superficie adyacente a la matriz. Recuadro a $650,000\times$, poniendo de manifiesto las partículas elementales con una forma poligonal y una delgada unión con la cresta. (Cortesía de H. Fernández Morán.)

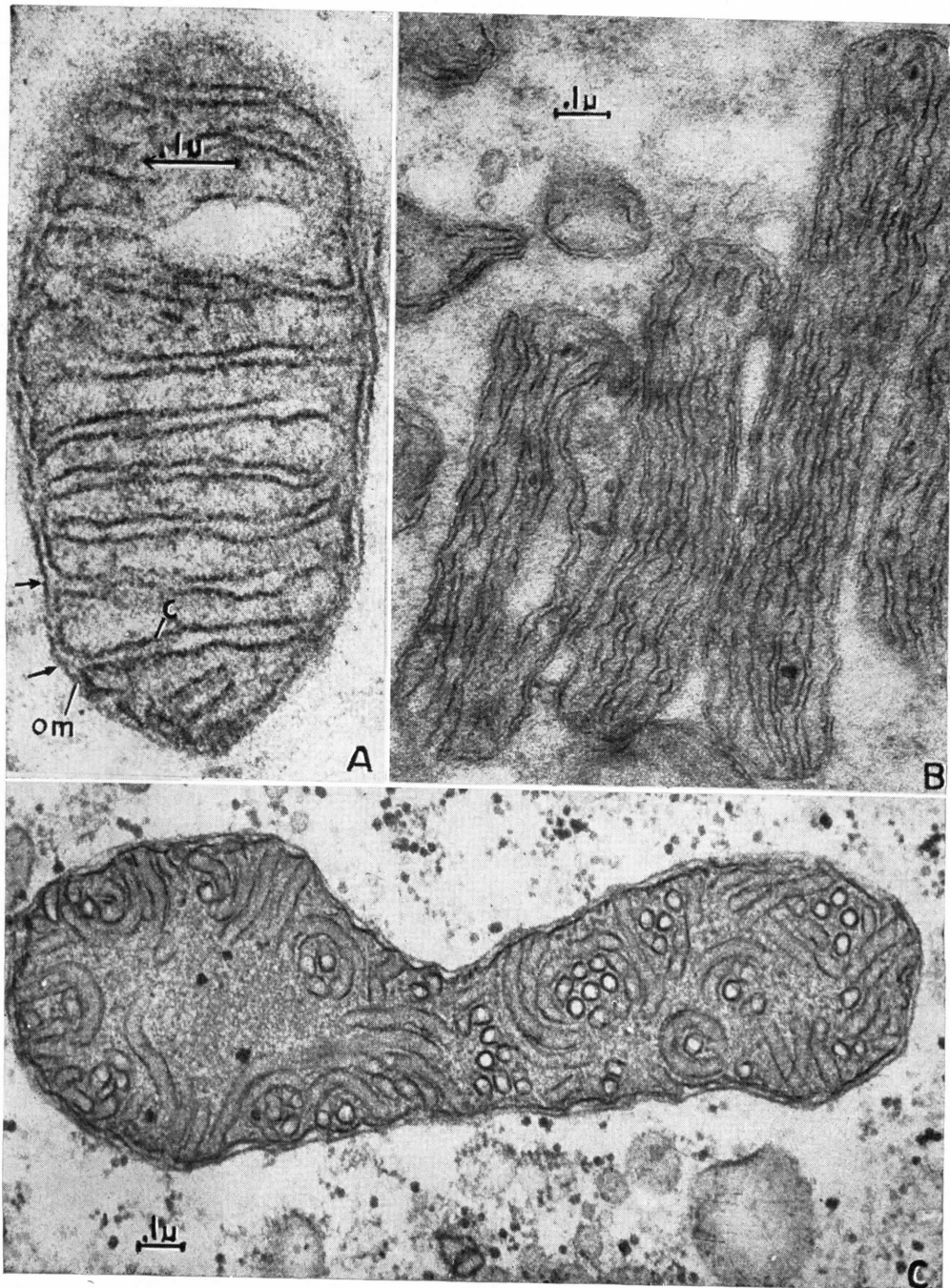


FIG. 11-6. Fotomicrografías electrónicas que indican las variaciones en la ultraestructura mitocondrial. A Crestas transversales (c) de testículo de rata; om, membrana externa; las flechas indican el origen de las crestas en la membrana interna. B Crestas longitudinales en mitocondrias de espermatocitos del ovotestis de *Hélix*. C Crestas tubulares en el *Paramecium*. A, 130,000 $\times$; B, 68,000 $\times$; C, 60,000 $\times$. (Cortesía de J. André.)

presumiblemente en una etapa muy temprana de la evolución y que fue transmitida luego sin cambios considerables desde los protozoarios a los mamíferos y desde las algas hasta las plantas fanerógamas. Pese a ello, es dable observar variaciones considerables. Así, los pliegues laminados de la membrana interna, o crestas (fig. 11-6), pueden disponerse longitudinalmente (por ejemplo, en el nervio y músculo estriado), y también ser simples o ramificadas, formando retículos complejos. En los protozoarios, en los insectos y en las células de la zona glomerular de las suprarrenales, los pliegues pueden constituir túbulos en vez de láminas y su agrupamiento da lugar a estructuras que poseen una organización regular (fig. 11-7, A).

Otra variación es la del número de crestas por unidad de volumen de la mitocondria. Mientras que las mitocondrias de las células hepáticas y germinales tienen pocas crestas y abundante matriz, en ciertas mitocondrias de células musculares el número de crestas suele ser muy grande y existir muy escasa matriz. En algunos casos, las crestas son tan numerosas que presentan una disposición casi cristalina.¹⁶

La mayor concentración se encuentra en los múscu-

los alares de los insectos. En general, parece existir una correlación entre el número de crestas y la actividad oxidativa de las mitocondrias (véase más adelante).

Una variación particularmente interesante en la estructura fina es la que se observa en células de diferentes regiones de la corteza adrenal (fig. 11-7), en donde las mitocondrias, además de intervenir en las oxidaciones celulares, actúan activamente en la síntesis de las hormonas esteroides.¹⁷

Otro ejemplo está dado por el cuerpo *mitochondrial*, encontrado en las espermátidas de algunos insectos.¹¹ En las espermátidas tempranas, todas las mitocondrias se acumulan en una región del citoplasma cerca del núcleo. Posteriormente se aglutinan en un solo cuerpo mitocondrial que experimenta un intenso proceso de fusión y remodelamiento.

Relación con los lípidos. Desde los tiempos de Altmann, varios autores observaron que los *depósitos de lípidos* pueden estar relacionados con las mitocondrias. En las células pancreáticas y hepáticas, después de un corto período de ayuno, existen mitocondrias que entran en relación con las gotas de lípidos por adhesión a la superficie curva de éstas. La re-

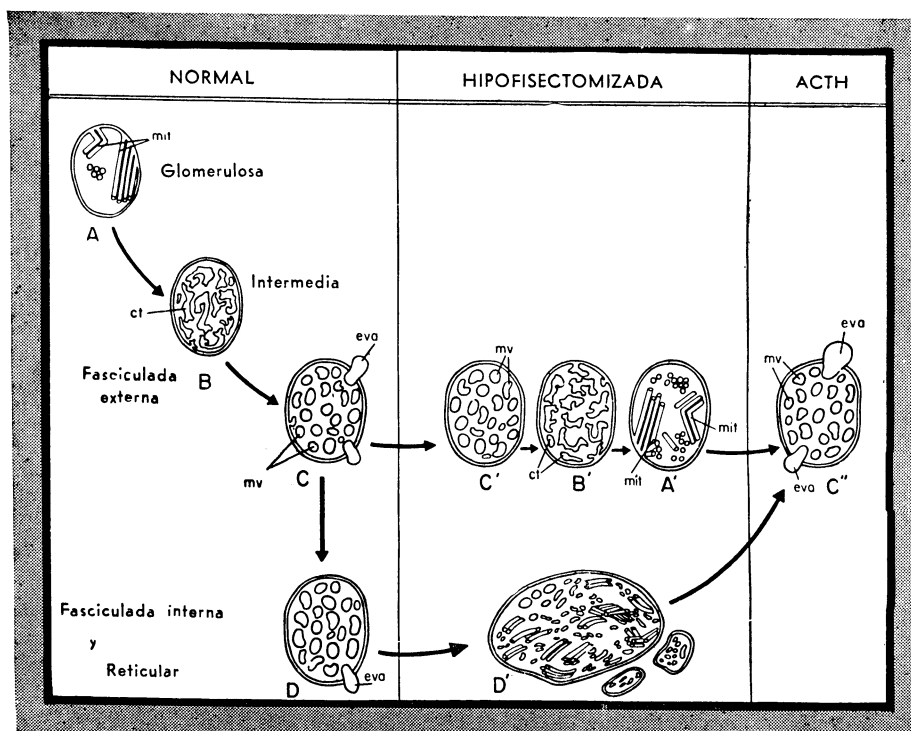


Fig. 11-7. Esquema general de los cambios mitocondriales encontrados en la corteza suprarrenal por la hipofisectomía y la terapia hormonal. A, B, C y D Mitocondrias normales de las zonas glomerular, intermedia, fascicular externa, fascicular interna y reticular. C', B' y A' Cambios progresivos de las mitocondrias de la zona fascicular externa que conducen a una imagen similar a la de las células glomerulares (A) (nótese la falta de vacuolas expulsadas). D' Condriosfera de las zonas fascicular interna y reticular, formada por la fusión de mitocondrias alteradas. C'' Mitocondrias de la zona fascicular después de la inyección de ACTH en animales hipofisectomizados. Véase el restablecimiento de la estructura vesicular y las vacuolas que salen de la mitocondria. (De D. D. Sabatini, E. De Robertis y H. B. Bleichmar.)

lación puede ser tan estrecha que sólo se observa la membrana mitocondrial interna adyacente en ciertas regiones del lípido. Las imágenes suministradas por el microscopio electrónico sugieren un activo proceso de utilización de los lípidos, que tienen lugar por acción de las oxidasas de los ácidos grasos presentes en las mitocondrias.¹⁸

Acumulación de proteínas y otras sustancias. En las mitocondrias de hígado de anfibios examinadas con el microscopio óptico, se descubrió la acumulación de un pigmento derivado de la hemoglobina con una reacción positiva para los iones férricos.¹⁹ Una interesante observación con el microscopio electrónico ha sido la demostración de moléculas de ferritina den-

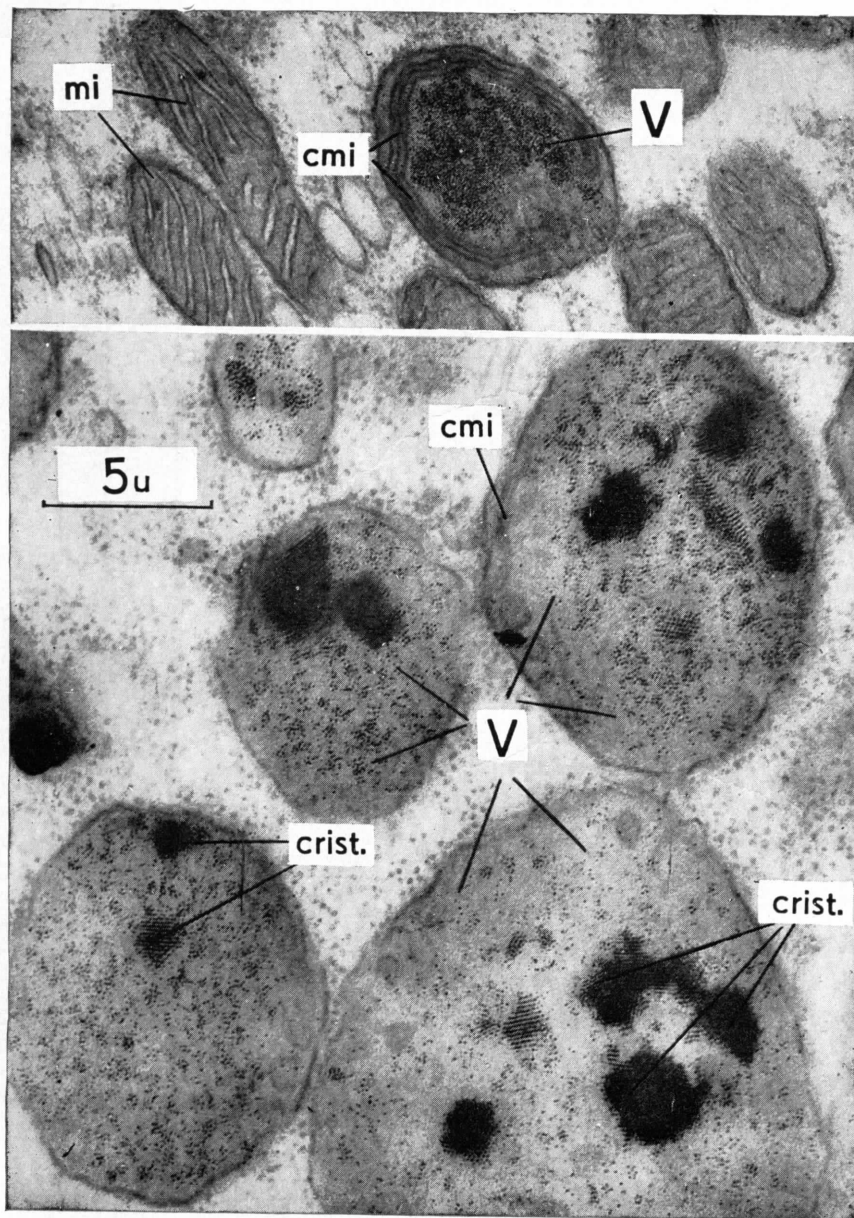


FIG. 11-8. Fotomicrografías electrónicas de las mitocondrias del huevo de *Planorbis*. Arriba. Mitocondrias normales con crestas y una de ellas con una acumulación de moléculas de proteína. cmi Cresta mitocondrial; V, vitelo. Abajo. Igual descripción, pero con mayor desarrollo. Las mitocondrias están en vías de trasformación en plaquetas vitelinas. Las moléculas tienen una disposición cristalina (crist.) 50,000 X. (Cortesía de P. Favard y N. Carasso.)

tro de las mitocondrias, en enfermos que padecen de anemia hereditaria de Cooley.²⁰ Otro ejemplo se encontró en la formación de los cuerpos vitelinos en huevos del molusco *Planorbis*.²¹ Uno de los medios por los cuales se forman estos cuerpos que contienen proteínas es por la transformación de las mitocondrias. En los ovocitos jóvenes existen mitocondrias típicas, en cuyo interior aparecen numerosas moléculas densas de proteína.

En estadios más avanzados, las mitocondrias pueden transformarse en cuerpos vitelinos más voluminosos, en los que las masas de moléculas de proteína adquieren una disposición regular cristalina (fig. 11-8). En ovocitos de anfibios, también se forman cuerpos vitelinos de forma hexagonal y con una estructura cristalina en el interior de las mitocondrias.²²

Degeneración de las mitocondrias. Las mitocondrias son estructuras más bien lábiles que pueden alterarse rápidamente por la acción de diversos agentes. Constituyen uno de los indicadores más sensibles de una lesión de la célula. Al principio algunos de estos cambios pueden ser reversibles y retornar a la normalidad dentro de ciertos límites. Sin embargo, cuando la alteración alcanza un extremo determinado, se vuelve irreversible, lo cual se interpreta generalmente como un signo de degeneración de la mitocondria. En esencia, existen tres tipos de cambios: 1) fragmentación en gránulos seguida de lisis y dispersión, 2) intenso hinchamiento con transformación en grandes vacuolas, 3) gran acumulación de materiales diversos con transformación de las mitocondrias en gránulos hialinos. Este último cambio es característico de la denominada tumefacción turbia y de la degeneración hialina que frecuentemente termina con la muerte de la célula.

Una observación relativamente habitual, en células que de todas maneras son normales, es la presencia de mitocondrias degeneradas en focos de autólisis, constituyendo un tipo de lisosoma, el citolisosoma.

Otro tipo de degeneración consiste en la fusión de mitocondrias, para formar grandes cuerpos denominados *condriosferas*, que han sido encontrados en pacientes con escorbuto y parecen ser normales en la glándula suprarrenal del hámster.²³ En este caso, en las regiones más profundas de la corteza existen mitocondrias que sufren un proceso de aplastamiento en capas finas y multilaminadas. Al mismo tiempo se produce la aposición concéntrica de varias de estas mitocondrias, proceso que conduce a la formación de condriosferas laminares voluminosas.

FUNCIONES MITOCONDRIALES

Las diferentes funciones de las mitocondrias están en relación tan íntima con la estructura, que ambas no pueden estudiarse aisladamente.

Algunos aspectos históricos sobre este tema fueron considerados en el capítulo 1 y en la introducción del presente. Sólo a partir de los trabajos de Hogeboom y colaboradores (1948),¹ el aislamiento mitocondrial se convirtió en un procedimiento de rutina en muchos laboratorios, permitiendo un rápido avan-

ce en las investigaciones sobre función mitocondrial.^{24, 25}

Desde las primeras investigaciones se demostró que las mitocondrias tenían una composición lipoproteica, con un 65 a 70 por ciento de proteínas y un 25 a 30 por ciento de lípidos, la mayor parte de los cuales están representados por fosfátidos (lecitina, cefalina, etcétera) y por pequeñas cantidades de colesterol y otros lípidos. El ácido ribonucleico (ARN) ha sido encontrado constantemente con valores de alrededor del 0.5 por ciento del peso seco. Después del aislamiento de las mitocondrias, se pueden seguir dos técnicas de investigación. En una de ellas se las estudia como partículas intactas, mientras que en la otra se desintegran estas partículas en unidades cada vez más pequeñas conteniendo algunos de sus grupos enzimáticos activos. Ambos procedimientos son muy eficaces para dar una imagen de la organización macromolecular de las mitocondrias.

Sistemas enzimáticos mitocondriales

Esta sección requiere ciertos conocimientos bioquímicos a fin de comprender los numerosos mecanismos enzimáticos con los cuales las mitocondrias están relacionadas (véase, también, cap. 5). Para dar una idea numérica acerca de su complejidad, diremos que en una sola mitocondria existen más de 70 enzimas y coenzimas que trabajan de manera ordenada, así como también múltiples cofactores y metales que cooperan en las funciones mitocondriales.

El único combustible que necesitan es el fosfato y el adenosindifosfato (ADP), y el producto final es el ATP, además del CO₂ y el H₂O. En la figura 11-9 se indica el camino final común de las oxidaciones biológicas que se producen en el interior de las mitocondrias. Las tres sustancias alimenticias principales de la célula (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) se degradan finalmente en el citoplasma en unidades de dos carbonos que se unen a la coenzima A (acetil-coenzima A). Una vez que ésta penetra en la mitocondria, el grupo acetato entra en el ciclo *tricarboxílico de Krebs* (o *del ácido cítrico*), y después de una serie de pasos complejos en los que intervienen varias enzimas, se descarboxila dando CO₂. En varios puntos del ciclo, por la acción de deshidrogenasas, son extraídos pares de electrones (o los átomos de H equivalentes)

que penetran en la *cadena respiratoria* o *sistema transportador de electrones*.

El principal sistema transformador de la energía de la mitocondria es la cadena respiratoria o sistema transportador de electrones, que incluye una serie de componentes vinculados entre sí funcional y espacialmente, y en íntima relación con la estructura mitocondrial. Los principales componentes de la cadena respiratoria son dos enzimas flavoproteicas (succino-deshidrogenasa y DPN-deshidrogenasa), cuatro citocromos y también hierro no hémico, cobre y coenzima Q. En tres puntos de esta cadena existen mecanismos transformadores que emplean la energía perdida por un par de electrones, para formar ATP a partir del ADP y del fosfato. Debido a ello, se dice que la *cadena respiratoria* está normalmente *acoplada a la fosforilación*.

Localización de los sistemas enzimáticos mitocondriales. Si se somete una suspensión mitocondrial a vibraciones sónicas, las proteínas solubles contenidas en la matriz se liberan, dejando la parte membranosa en la fracción sedimentable. La cantidad de proteínas solubles liberada está en relación con la estructura. En las mitocondrias del hígado existen más proteínas solubles que en las mitocondrias del corazón, las que, por su parte, tienen estructura más compacta y crestas mucho más numerosas.

Estas proteínas solubles comprenden la mayoría de las enzimas presentes en los ciclos

de Krebs y de los ácidos grasos. La matriz también contiene diversos nucleótidos, lo mismo que nucleótido-coenzimas y electrólitos inorgánicos, como K^+ , PO_4H^- , Mg^{++} , Cl^- y SO_4^{--} . La fracción insoluble contiene todas las enzimas comprendidas en la cadena respiratoria, junto con las enzimas acopladoras de energía de la fosforilación oxidativa.

Ya fue mencionada la correlación existente entre el número de crestas por unidad de volumen y la velocidad de respiración. En células hepáticas, en las cuales este proceso es moderado, se calcula una superficie de 40 m² por gramo de proteína para las membranas internas (y crestas) mitocondriales. En músculos de insectos la superficie puede verse aumentada hasta diez veces.²⁶

Se ha sugerido que las crestas y las membranas internas de las mitocondrias poseen la mayoría, si no todas, de las enzimas correspondientes a esta cadena.

Observaciones espectrofotométricas²⁷ demuestran que los componentes de la cadena respiratoria se encuentran en cantidades equimoleculares; esto es, existe una molécula de succino-deshidrogenasa o DPN-deshidrogenasa por cada citocromo y citocromooxidasa en la cadena. Este y otros resultados sugieren que las enzimas están organizadas en "juegos" compactos que se encuentran distribuidos regularmente sobre las crestas mitocondriales. Existirían 15.000 "juegos" de tal tipo en una mitocondria del hígado, mientras que en el músculo alar de un insecto habría unos 100.000.

Puede calcularse que cada "juego" se halla separado del otro por alrededor de 200 Å dentro del espesor de la membrana interna.

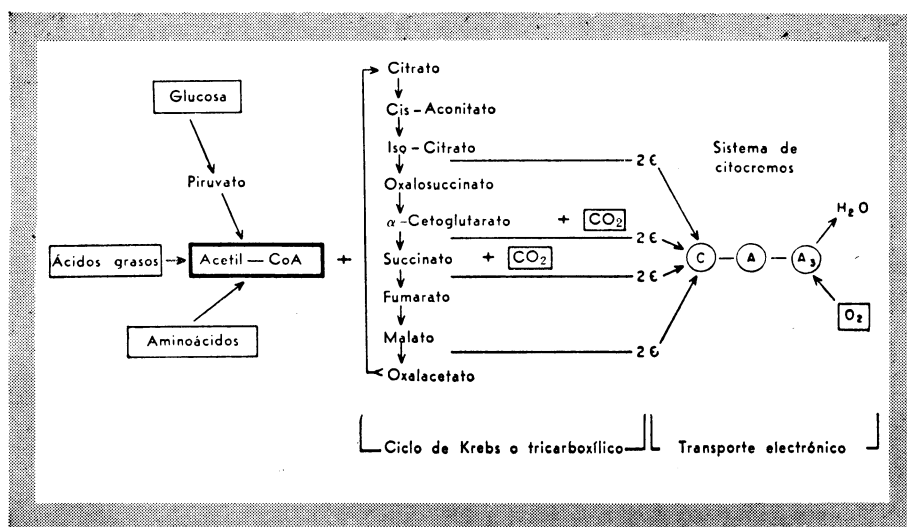


FIG. 11-9. Representación esquemática del ciclo de Krebs (ciclo tricarboxílico) y del sistema transportador de electrones, que se encuentran en las mitocondrias. (De A. L. Lehninger.)

Otros cálculos indican que del 20 al 40 por ciento de la membrana proteica estaría constituido por la cadena respiratoria dispuesta como en "estado sólido".

Asimetría y localización ultraestructural del factor de acoplamiento y la cadena respiratoria. Recientemente se ha demostrado que la enzima que acopla la cadena respiratoria y la fosforilación para producir ATP (fig. 11-9) es una ATPasa especial (factor de acoplamiento F_1 de Racker o ATP-sintetasa), la cual posee un peso molecular de 284.000 y corresponde morfológicamente a las partículas elementales de la membrana mitocondrial interna (fig. 11-5).¹⁵ Si se extraen tales partículas de las membranas, desaparece el acoplamiento de la oxidación fosforilativa. Al producirse la reasociación de estos dos componentes se restituye tanto la estructura como la función.²⁸

La figura 11-3 pone de manifiesto dos disposiciones moleculares propuestas para la ubicación de la cadena respiratoria en mitocondrias y su relación con las proteínas estructurales, lípidos y las partículas F_1 de Racker. La parte superior muestra la probable disposición en una mitocondria intacta, en la cual

las partículas F_1 no sobresalen de la superficie interna de las crestas. El modelo inferior se asemeja más al observado después de la ruptura osmótica y tinción negativa de las mitocondrias, caso en el que las partículas F_1 corresponden a las partículas elementales de Fernández-Morán (fig. 11-5). El esquema puntualiza la relación existente entre cada cadena respiratoria y tres ATP-sintetasas, sitios en donde se producen las tres moléculas de ATP. Otro detalle de la figura 11-3 es el que evidencia la típica disposición asimétrica de la cadena respiratoria y del factor F_1 en la membrana mitocondrial interna. Hace poco tiempo se comprobó la asimetría de la succinato-deshidrogenasa y del citocromo C mediante el uso de indicadores específicos que producen el depósito de material de alta densidad electrónica sobre las crestas mitocondriales. Tanto con un tetrazol especial, que es convertido en formazán por la succinato-deshidrogenasa (véase cap. 7), como con la 3',3'-diaminobencidina (DAB), que es oxidada por el citocromo C, puede establecerse que los depósitos de alta densidad electrónica se localizan en la superficie externa de la cresta mitocondrial (fig. 11-10).

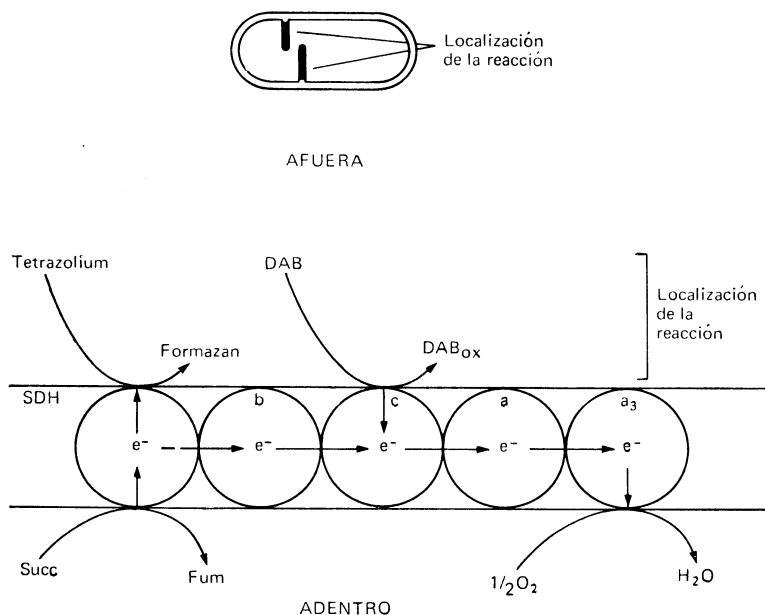


FIG. 11-10. Esquema que pone de manifiesto la disposición asimétrica de la cadena respiratoria en la cresta mitocondrial. La reacción de la succinato-deshidrogenasa (SDH) produce un depósito de formazán en el borde externo de la cresta. Lo mismo se observa con el DAB (3',3'-diaminobencidina) que reacciona con el citocromo C. En la parte superior se incluye un esquema de la imagen proporcionada por el microscopio electrónico. Interpretación de los resultados de Seligman y col.²⁹ (Cortesía de A. L. Lehninger.)

Separación y propiedades de las membranas mitocondriales

Mediante el uso de centrifugación en gradientes de densidad, se han separado las dos membranas mitocondriales.^{30, 33} La figura 11-11 ejemplifica uno de los procedimientos más usados en este tipo de fraccionamiento, que permite la separación de las dos membranas y otros componentes de las mitocondrias hepáticas.³⁴

La tabla 11-2 enumera las enzimas presentes en las diversas fracciones mitocondriales y la tabla 11-3, las actividades de algunas enzimas que pueden considerarse como verdaderos marcadores de dichas fracciones. Por medio de la separación de la membrana externa con digitonina, se ha obtenido el denomi-

TABLA 11-2. Distribución de enzimas en la mitocondria

(Según A. L. Lehninger, 1969)

Membrana externa:

Monoaminoxidasa.
NADH-citocromo-reductasa rutenona-insensible.
Quinurenina-hidroxilasa.
CoA-ligasa de ácidos grasos.

Espacio entre las membranas externa e interna:

Adenilato-quinasa.
Nucleósido-difosfoquinasa.

Membrana interna:

Enzimas de la cadena respiratoria.
ATP-sintetasa.
Succinato-deshidrogenasa.
 β -Hidroxibutirato-deshidrogenasa.
Carnitina-acetil-trasferasa.

Matriz:

Malato e isocítrico-deshidrogenasas.
Fumarasa; aconitasa.
Citrato-sintetasa.
 α -Cetoácido-deshidrogenasa.
Enzimas de la β -oxidación.

nado *mitoplasto*, entidad que conserva intactas su membrana interna y matriz (fig. 11-12). El mitoplasto presenta prolongaciones a modo de pseudópodos y es capaz de llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Tal preparación ha permitido precisar la localización exacta de los sistemas enzimáticos mitocondriales y destacar interesantes diferencias existentes entre ambas membranas.

La *membrana externa* es una fracción más liviana, con mayor contenido de colesterol, elevada proporción de fosfatidil-inositol y, por el contrario, escasa cantidad de cardiolipina. Estas características químicas y también la presencia de NADH-citocromo C-reductasa, la asemejan a la membrana del retículo endoplásmico (microsomias). El sistema de la NADH-citocromo C-reductasa es responsable de la oxidación del NADH extramitocondrial y contiene una flavoproteína y un citocromo b_5 . Asociadas a la membrana externa se encuentran la quinurenina-hidrolasa y la CoA-ligasa de los ácidos grasos (tabla 11-2). Es interesante destacar que la membrana externa contiene toda la monoaminoxidasa de las mitocondrias hepáticas, de manera que esta enzima puede servir como marcador de dicho componente³¹ (tabla 11-3).

Desde el punto de vista morfológico, la membrana externa carece de partículas elementales, que en cambio son prominentes en la membrana interna teñida negativamente (fig. 11-5). Como se observa en la figura 11-13, en estas preparaciones la membrana externa tiene el típico aspecto de "valija plegada".

La fracción *mitoplástica* es más densa y contiene a los componentes de la cadena respiratoria, incluyendo los citocromos y la coenzima Q,³⁵ así como las enzimas relacionadas.

TABLA 11-3. Actividad enzimática de varios componentes mitocondriales

(De C. Schnaitman y J. W. Greenwalt)

<i>Componente</i>	<i>Membrana interna</i>	<i>Membrana externa</i>	<i>Matriz</i>	<i>Cámara externa</i>
Marcador enzimático	Citocromooxidasa	Monoaminoxidasa	Malatodeshidrogenasa	Adenilatoquinasa
Actividad específica del marcador en el componente	9315	551	3895	6690
Actividad específica en la mitocondria total	1980	22	2608	421
Porcentaje de proteínas en el componente	21.3	4	66.9	6.3

Hay también una notable concentración de cardiolipina (poliglicerofosfátidos), que parece ser importante en todos los sistemas implicados en el transporte electrónico.³⁶ También se encuentran en esta fracción la mayor parte de las enzimas del ciclo de Krebs y las que intervienen en la oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, como ya se ha visto, todas ellas están presentes en la matriz y pueden ser separadas de la membrana mediante tratamientos más energéticos (tabla 11-2).

La figura 11-11 demuestra cómo el tratamiento del mitoplasto con un detergente lleva a la separación de la membrana interna y la matriz. Otra fracción soluble, originada probablemente en el espacio que separa ambas membranas (cámara externa), contiene a las enzimas adenilatoquinasa y nucleósido-difosfoquinasa.

La tabla 11-2 incluye las principales enzimas que existen en los distintos componentes de una mitocondria.³⁷ Usando métodos citotómicos en el nivel del microscopio electrónico, la carnitina-acetil-trasferasa y otras acetil-trasferasas han sido localizadas en el borde externo de la membrana interna y en el borde interno de la membrana externa.³⁸

Las semejanzas entre la membrana externa y el retículo endoplásmico son de gran interés respecto del mecanismo de la biogénesis mitocondrial y de la interpretación que postula a las mitocondrias como organismos simbiotes de células superiores (véase más adelante). Esas similitudes también se reflejan en

las cifras de vida media, obtenidas con el uso de precursores marcados para proteínas. Se halló para la membrana externa una vida media de 5,2 días (comparable a los 5,7-6,7 días de los microsomas), para la membrana interna de 12,6 y para las proteínas mitocondriales solubles de 11,6 días.³⁹

Permeabilidad de las membranas mitocondriales

Existen importantes diferencias de permeabilidad entre ambas membranas mitocondriales. La membrana externa es permeable a electrólitos, agua, sacarosa y algunos polisacáridos, mientras que la membrana interna es normalmente impermeable a los iones (H^+ , OH^- , Na^+ , Cl^- , K^+ y Mg^{++}) y a la sacarosa. Mecanismos específicos de transporte parecen estar comprendidos en el pasaje de ADP, ATP e intermediarios del ciclo de Krebs.³⁷ Estos mecanismos de transporte son importantes, puesto que los metabolitos provenientes del citoplasma (piruvato, ácidos grasos y glicerofosfato) deben penetrar en la matriz antes de ser oxidados. Asimismo, el ADP y el fosfato han de pasar a este compartimento, en tanto que el ATP formado lo abandona. Los transportadores podrían constituir mecanismos de control para los intermediarios del ciclo de Krebs y para los nucleótidos de la adenina y ser determinados genéticamente. Algunas evidencias indican que estos sistemas transportadores (*carriers*) estarían

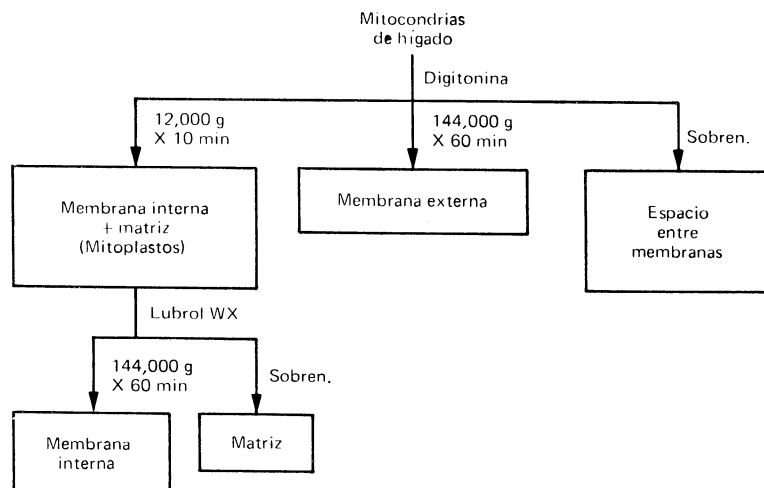


FIG. 11-11. Método de fraccionamiento utilizado para separar las membranas externa e interna de la mitocondria. Este método permite también separar la matriz mitocondrial y obtener información sobre el contenido de la cámara externa. (Cortesía de C. Schnaitman y J. W. Greenwalt.)

localizados en las uniones estrechas entre las membranas externa e interna (véase más adelante Lehninger, 1969).

Cambios de conformación en las mitocondrias

Al comienzo de este capítulo se mencionó la existencia, en células vivientes, de ciclos de contracción de baja amplitud, los cuales son

susceptibles de ser asociados con etapas de la fosforilación oxidativa. Observaciones similares, pero de mayor precisión, fueron hechas en mitocondrias aisladas.^{40, 41} Esos cambios de baja amplitud —revelables por modificaciones en la densidad óptica o en la dispersión luminosa— se interpretaron como índice de pequeñas variaciones volumétricas resultantes de un fenómeno de contracción e hinchazón ligado a procesos energéticos. Sin embar-

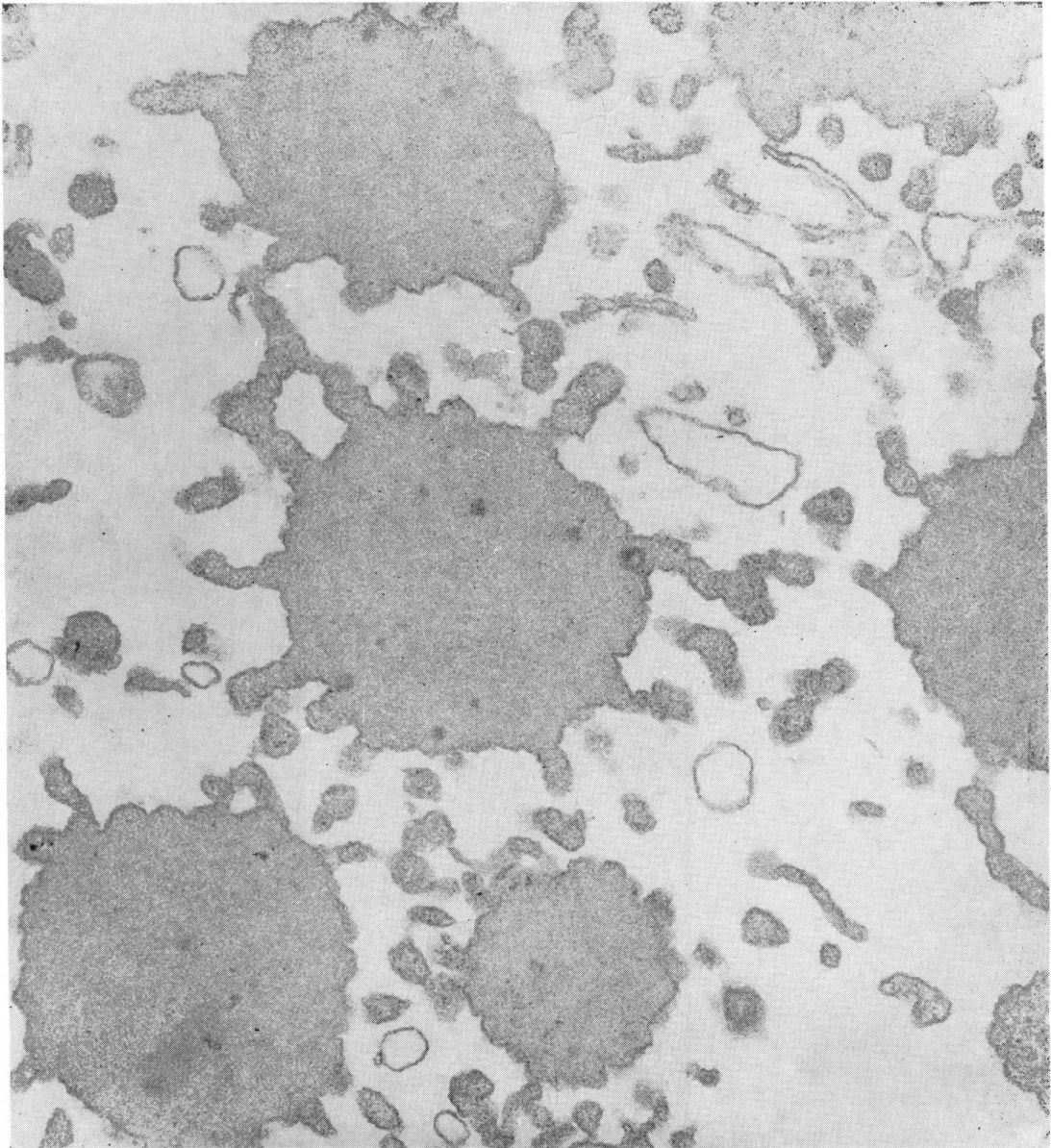


FIG. 11-12. Fotomicrografía electrónica de las membranas internas y la matriz mitocondrial (mitoplasto) separadas de las mitocondrias del hígado. Obsérvense las prolongaciones digitiformes del mitoplasto, 80,000 $\times$. (Cortesía de C. Schnaitman y J. W. Greenwalt.)

go, los cambios en absorbanza (extinción) y dispersión lumínica (*light-scattering*) podrían también reflejar un reordenamiento de la estructura mitocondrial interna sin modificaciones reales de su tamaño. Recurriendo a un método muy simple, que permite la fijación de mitocondrias aisladas en diferentes etapas de su metabolismo, fueron observados cambios ultraestructurales reversibles.⁴²

La conformación interna de las mitocondrias puede variar entre dos estados extremos (fig. 11-14). Uno es el *estado ortodoxo*, observado comúnmente cuando se estudian tejidos intactos. El otro corresponde al *estado condensando*, en el cual hay una contracción intensa del compartimiento mitocondrial interno, con acumulación de fluidos en el compartimiento externo (es decir, entre ambas membranas mitocondriales). En la conformación ortodoxa, la membrana interna presenta las características crestas; la matriz ocupa

prácticamente todo el volumen de la mitocondria y tiene aspecto granular o reticular (figura 11-14, *a*). En la conformación condensada, el plegamiento de la membrana interna se realiza al azar y la matriz, ahora más homogénea, representa sólo cerca del 50 por ciento del volumen mitocondrial (fig. 11-14, *b*). Es interesante que durante ese estado sea posible observar en ciertos puntos la existencia de uniones estrechas entre las membranas interna y externa de la mitocondria. El funcionamiento del sistema de transporte electrónico se considera necesario para que pueda llevarse a cabo la transformación del estado condensado al ortodoxo. La inhibición de la cadena respiratoria mediante cianuro, antimicina A o amital, impide dicha transformación.⁴³ El estado ortodoxo se suscita cuando el ADP externo desciende y por consiguiente no hay sustrato para la fosforilación. Si en este momento se agrega ADP, la respiración aumenta

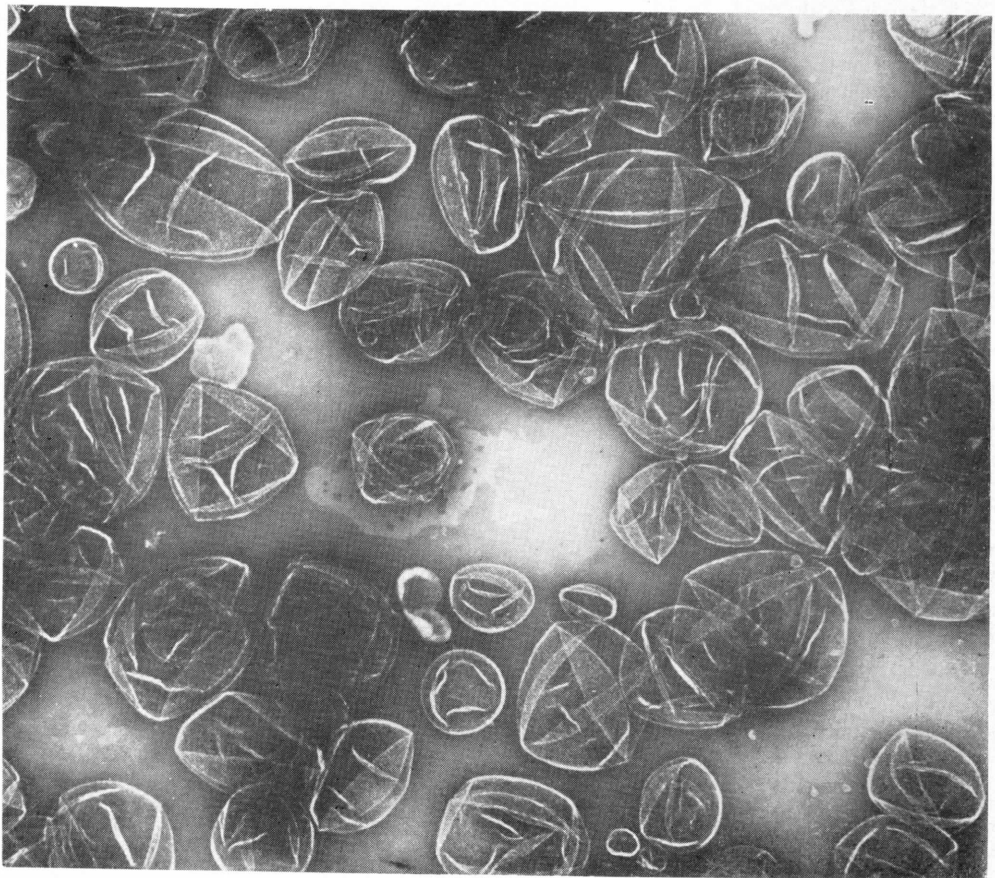


FIG. 11-13. Membranas mitocondriales externas, aisladas del hígado. Coloración negativa al microscopio electrónico. Véase el aspecto plegado de las membranas y la falta de partículas F_1 . 35,000 $\times$. (Cortesía de D. F. Parsons.)

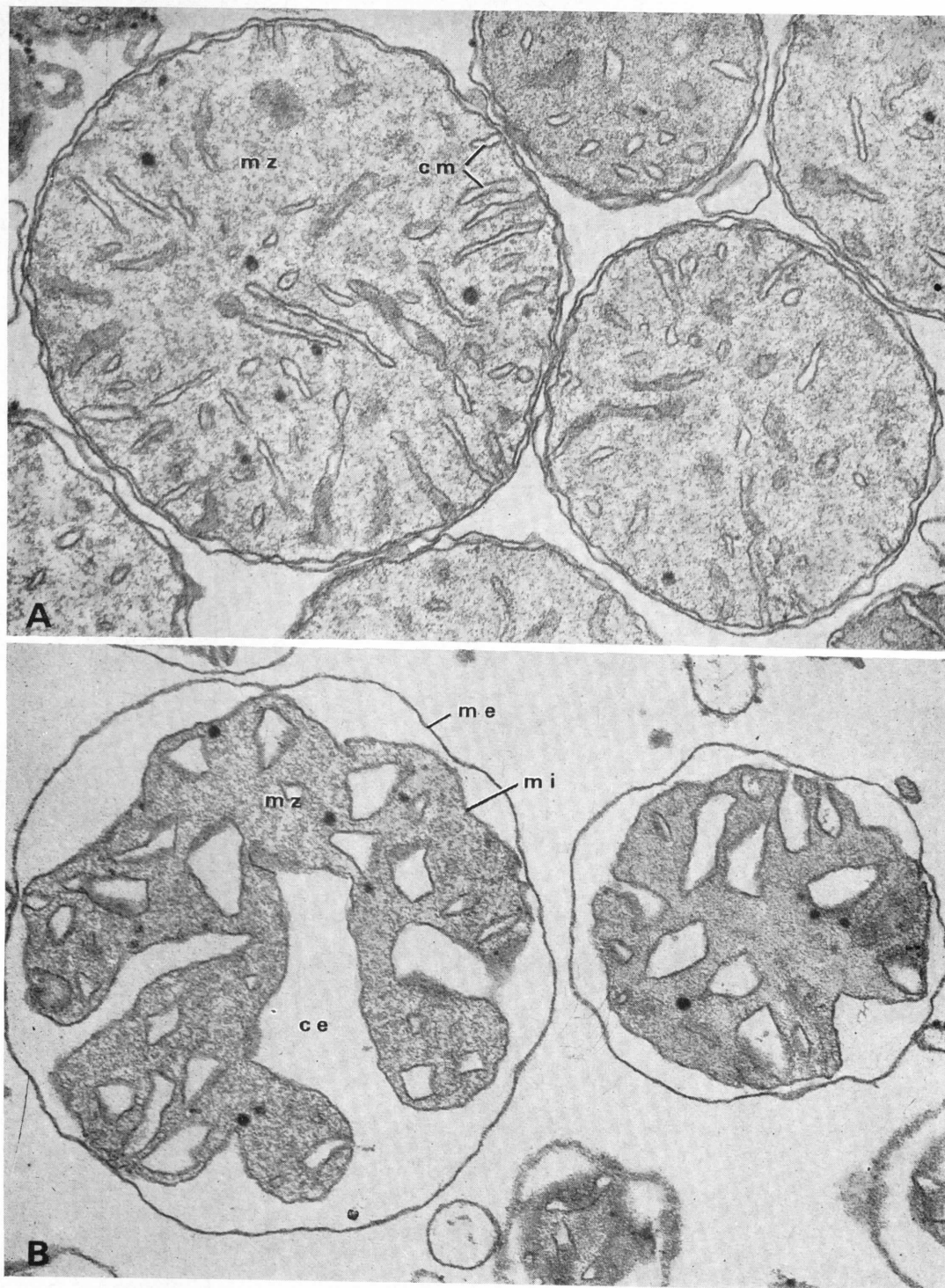


FIG. 11-14. Fotomicrografías electrónicas de mitocondrias de rata aisladas en dos estadios extremos de conformación. A Conformación ortodoxa: La membrana interna está organizada en crestas (c) y la matriz (m) llena toda la mitocondria. B Conformación condensada: Las crestas mitocondriales no se observan y la cámara externa (ce) representa alrededor del 50 por ciento del volumen. me, Membrana externa; mi, membrana interna. 90,000 $\times$. (Cortesía de C. R. Hackenbrock.)

rápidamente y tiene lugar la contracción de la membrana interna. Se cree que durante la transición del estado ortodoxo al condensado existen cambios tanto en la membrana interna como en la matriz. Aunque la membrana interna es la que contiene probablemente los elementos contráctiles o "mecanoenzimas",⁴⁴ en esta contracción también debe considerarse el posible papel de la matriz.

Hinchazón y contracción

En ausencia de ADP, el volumen de las mitocondrias puede aumentar entre tres y cinco veces con respecto a su valor normal. La adición de ATP o la reanudación del mecanismo respiratorio permite también en este caso que la mitocondria recupere su tamaño original. Durante dichos cambios se produce un aumento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales. Estos estudios han demostrado que las mitocondrias poseen una función importante en la incorporación y eliminación de líquidos intracelulares. Una mitocondria aislada reacciona como un osmómetro en la dirección de los cambios de la presión osmótica pero, como se ha dicho antes, existen otros factores importantes susceptibles de producir cambios semejantes. Son agentes productores de hinchamiento el ion fosfato y el Ca^{++} , el

glutatio reducido y, en particular, la hormona tiroidea (tiroxina). Ésta es la más efectiva y puede ocasionar hinchamiento en concentraciones fisiológicas.

Como las mitocondrias poseen dos membranas y dos compartimientos desde el punto de vista estructural, se dilata fundamentalmente de dos maneras (fig. 11-15). El agua, K^+ y Na^+ penetran muy rápidamente a través de ambas membranas y de ellas dependerán los cambios que se observan en la figura 11-15, C y E, con dilución de la matriz. Por el contrario, la sacarosa atraviesa con más rapidez la membrana externa y puede causar una dilatación de la cámara externa o del espacio situado entre las crestas, sin producir dilatación de la matriz (figura 11-15, B y D).

En la figura 11-16 se aprecia el efecto dilatador de la tiroxina, evaluado mediante la absorción de la luz y la contracción reversible producida en el mismo sistema por el agregado del ATP. Se comprueba también en este experimento que la relación $\frac{P}{O}$ (es decir, la relación entre el fósforo fijado y el O_2 consumido) disminuye por la acción de la tiroxina y vuelve a su valor normal por el ATP. Estos hechos demuestran que la incorporación de agua está asociada con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que es restituida a sus valores normales juntamente con la eliminación del agua. Las medidas del ATP empleado durante la contracción

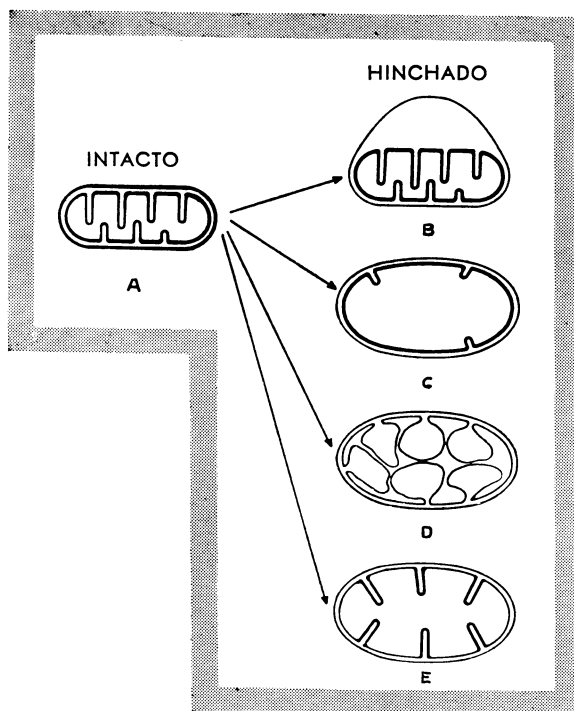


FIG. 11-15. Estructura de mitocondrias en el estado intacto normal (A) y en diferentes tipos de hinchazón. La entrada de solutos en la cámara externa produce dilatación del espacio intermembranoso (B) o de los espacios entre las crestas (D). El pasaje hacia la cámara interna causa dilución de la matriz, con despliegue de las crestas (C) o sin él (E). (De A. L. Lehninger.)

indican que las mitocondrias pueden hacer salir activamente el agua y pequeñas moléculas en la proporción de varios cientos por cada molécula de ATP utilizada.³

Los descubrimientos mencionados, así como los cambios de baja amplitud que se observaron en la célula viviente,⁴⁶ sugieren que las mitocondrias, además de tener la función fundamental de centro de fosforilación oxidativa, son capaces de realizar un transporte activo de agua y iones (véase cap. 21).

Acumulación de cationes en la mitocondria

Si bien la respiración y la fosforilación oxidativa son las funciones mitocondriales más importantes, se verificó que las mitocondrias están relacionadas también con la acumulación de cationes. Así, en mitocondrias aisladas el Ca^{++} puede concentrarse hasta varios cientos de veces.⁴⁷ También se halló que el ion fosfato penetraba en la mitocondria junto con el Ca^{++} , en una relación calcio/fosfato de 1:7 (aproximadamente igual a la hallada en la hidroxiapatita ósea). La cantidad de Ca^{++} y fosfato acumulado puede ser tan grande que el peso seco aumenta hasta un 25 por ciento, y llegan a observarse depósitos microcristalinos dentro de la mitocondria.⁴⁸ Estos depósitos de fosfato de calcio han sido estudiados mediante microscopía electrónica y microincineración de alta resolución.⁴⁹

El proceso descrito ocurre normalmente en los osteoblastos que se hallan en tejidos en

calcificación. El almacenamiento de Ca^{++} y otros iones bivalentes, como el S^{++} y el Mn^{++} , reemplaza al sistema de transporte electrónico.⁵⁰ Es decir, que cuando las mitocondrias están en presencia de Ca^{++} no realizan fosforilación de ADP a ATP y en cambio acumulan Ca^{++} y fosfato. Sin embargo, tanto la fosforilación oxidativa como el acopio de Ca^{++} dependen del mantenimiento de la respiración celular (ciclo de Krebs). La concentración de Ca^{++} y otros cationes dentro de la mitocondria se acompaña de la salida de H^+ . Algunos antibióticos, como la valinomicina, aumentan la entrada de cationes actuando a modo de transportador (*carrier*). Debido a esa propiedad, se los denomina *ionóforos*. El efecto de estos antibióticos dependería de su capacidad para formar complejos catiónicos cargados eléctricamente (valinomicina) o neutros (nigericina). De acuerdo con Mitchell,⁵¹ los movimientos iónicos en la mitocondria están íntimamente relacionados con la estructura molecular de la membrana interna. Las enzimas implicadas en el sistema de transporte electrónico, particularmente la ATP-sintetasa o factor F_1 , no se distribuyen al azar sino que poseen una disposición vectorial en el espesor de la membrana; o sea, se encuentran polarizadas entre ambas superficies, comportándose anisotrópicamente²⁶ (figura 11-3). Como se observa en la parte superior de la figura 11-17, los electrones pueden pasar a través del sistema de oxidasas en la membrana, pero los H^+ son retenidos en un lado de ésta y los OH^- en el otro. Los OH^- ,

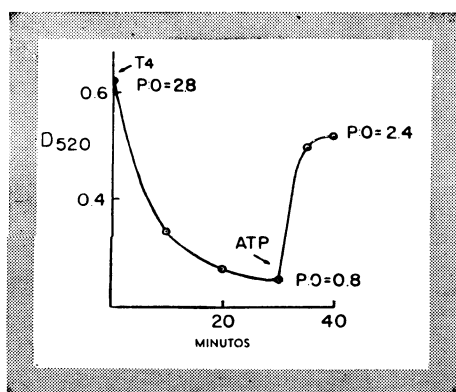


FIG. 11-16 Experimento que demuestra la acción de hinchamiento de las mitocondrias por la tiroxina (T_4) y su contracción por el ATP. Con la entrada de agua la densidad óptica disminuye; en presencia de ATP, las mitocondrias expelen el agua y la densidad se recupera. La relación P/O declina con el hinchamiento y se restaura por acción del ATP. (De A. L. Lehninger.)

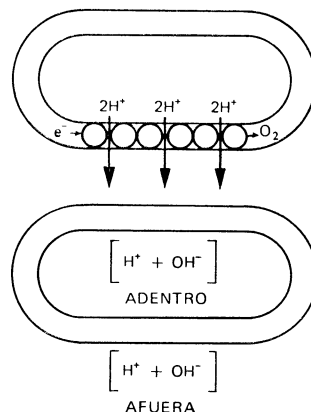


FIG. 11-17. Arriba. Esquema que muestra el sistema de transporte electrónico que bombea H^+ hacia afuera. Abajo. El resultado final, con un aumento de OH^- dentro de la mitocondria y la salida de H^+ . (Cortesía de A. L. Lehninger.)

alejados del fosfato mediante la acción del factor de acoplamiento F_1 , son neutralizados dentro de la mitocondria al mismo tiempo que el H^+ se libera hacia su superficie externa. Por medio de este mecanismo los OH^- se acumulan en la matriz (con su consiguiente alcalinización), mientras que el ácido pasa al exterior (fig. 11-17). Es interesante mencionar que los cloroplastos se comportan exactamente en forma inversa, bombeando hacia fuera OH^- y acumulando H^+ . Como se mencionará en párrafos posteriores, existe una notable similitud entre los sistemas transportadores de energía de las mitocondrias, cloroplastos y bacterias, lo cual sugiere un origen evolutivo común.

LA MITOCONDRIA COMO ORGANOIDE SEMIAUTÓNOMO

En los últimos tiempos se ha iniciado una nueva etapa en el estudio de la mitocondria y otros orgánoides celulares, al demostrarse cierto grado de autonomía en su comportamiento dentro de la célula. Las mitocondrias contienen moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ribosomas y, de esa manera, son capaces de sintetizar proteínas a partir de aminoácidos. Además de ello pueden divi-

dirse y por tanto ser transmisores de información biológica, lo cual representa en cierto modo un tipo de herencia citoplásmica. Estos descubrimientos recientes son también muy interesantes juzgados en su perspectiva histórica. Los primeros citólogos ya habían especulado con respecto al posible papel de los orgánoides. En 1890, Altmann y Schimper sostuvieron que las mitocondrias y los cloroplastos representaban formas parasitarias intracelulares, que habían penetrado en el citoplasma estableciendo una relación simbiótica. Las bacterias habrían originado a las mitocondrias, y las algas azul-verdosas a los cloroplastos. La denominación de bioblastos aplicada por Altmann a las mitocondrias destacaba su naturaleza autoduplicable (para mejor comprensión de esta sección el lector deberá familiarizarse con los capítulos de Biología molecular).

Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

Aunque Chevremont y colaboradores, entre 1956-1957 demostraron que en ciertas condiciones las mitocondrias de células en cultivo de tejidos daban la reacción de Feulgen positiva, hasta 1960 se pensó que el ADN estaba

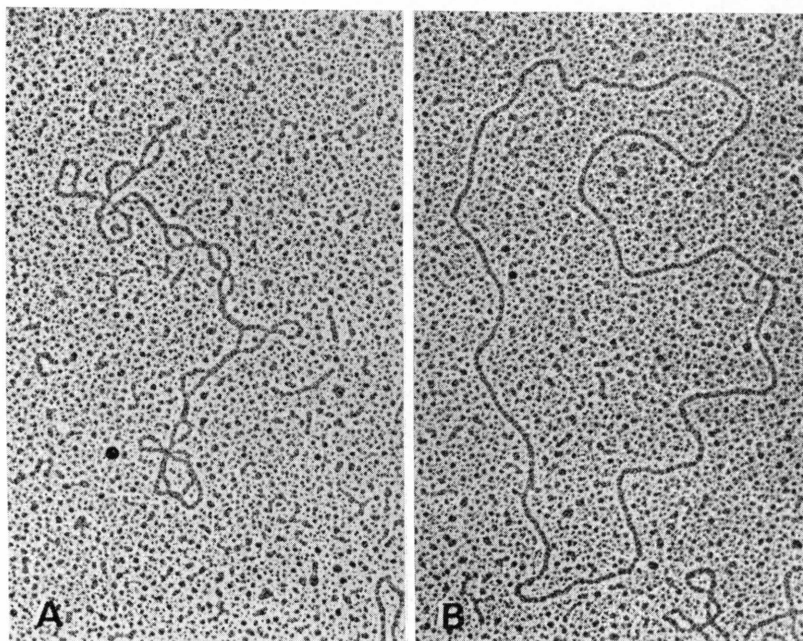


FIG. 11-18. Ácido desoxirribonucleico extraído de mitocondrias de hígado de rata y observado con sombreado metálico. A, configuración en círculo retorcido, y B, en círculo abierto. (Cortesía de B. Stevens.)

exclusivamente localizado en el núcleo. La pequeña cantidad de ADN presente en la fracción mitocondrial aislada por centrifugación, se consideraba como una resultante de la contaminación nuclear.

En 1963, M. y S. Nass⁵² observaron dentro de las mitocondrias la presencia de filamentos que fueron interpretados en esa oportunidad como moléculas de ADN; este hallazgo se confirmó luego plenamente, tanto en cortes como con la técnica de dispersión superficial de Kleinschmidt (véase cap. 6).

Cada mitocondria puede contener una o más moléculas de ADN, de acuerdo con su tamaño; es decir, cuanto más grande sea la mitocondria, más moléculas de ADN estarán presentes. La molécula de ADN mitocondrial aparece como una cadena doble muy enroscada y de forma circular (fig. 11-18). En la

mayoría de las especies estudiadas, la molécula de ADN tiene una longitud de alrededor de 5 μ .⁵³⁻⁵⁷ En la levadura y en la *Neurospora*, la molécula es más grande, lo cual indica la posibilidad de mayor información genética. El ADN mitocondrial difiere del nuclear en varias propiedades: el contenido de G-C es mayor y, consecuentemente, la densidad de flotación es también más elevada (véase M. Rabinowitz, 1968). Otra diferencia reside en la mayor temperatura de desnaturalización del ADN mitocondrial y la facilidad con que se renaturaliza. La cantidad de información genética transportada por este ADN se considera limitada y, por ende, es insuficiente para codificar todas las proteínas y enzimas que se hallan en el organoide. Si el ADN mitocondrial provee información para los ácidos ribonucleicos intrínsecos de transferencia y ribo-

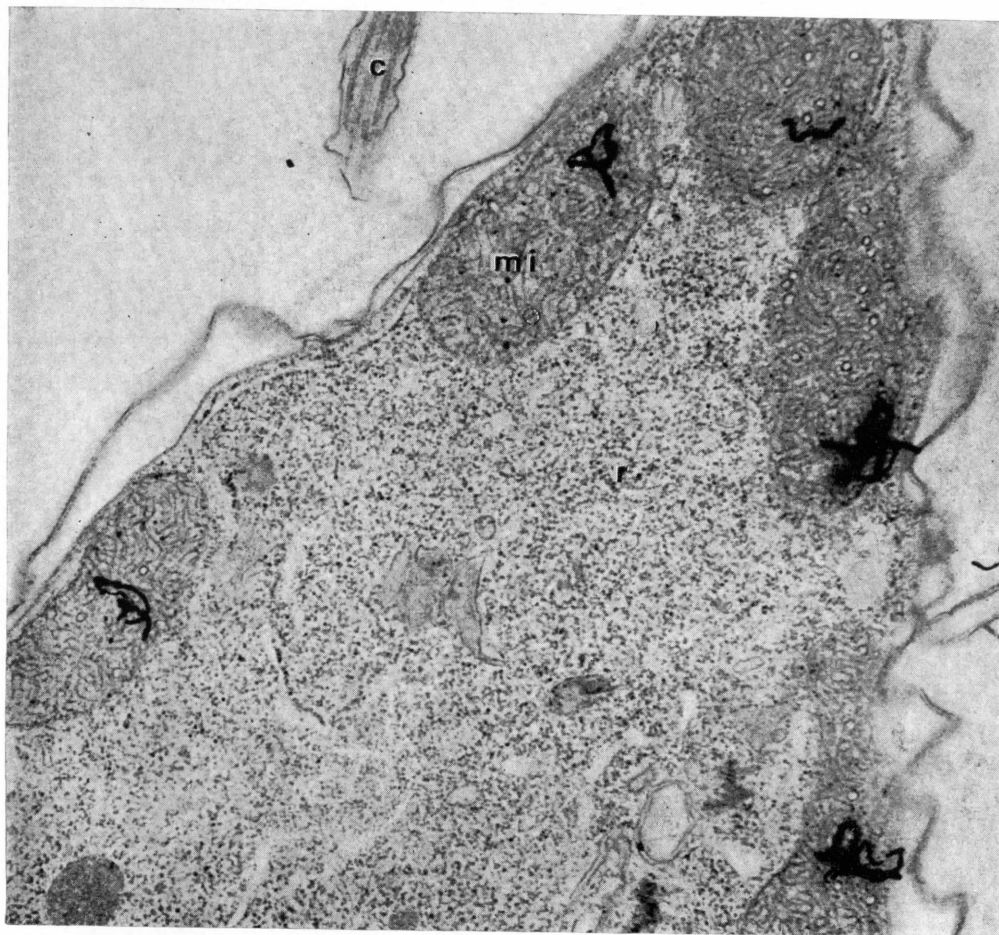


FIG. 11-19. Incorporación de timidina- H^3 en mitocondrias del infusorio *Tetrahymena pyriformis*. Se aprecia la localización del ácido desoxirribonucleico sintetizado, 31,000 $\times$. (Corresía de J. André.)

sómico, alrededor de un tercio de los nucleótidos deberían ser utilizados en este proceso. Los dos tercios restantes del ADN podrían codificar cerca de 3000 aminoácidos, que corresponderían a una proteína de 360,000 o diez proteínas de 36,000 Daltons. Lo más probable es que el ADN mitocondrial codifique algunas proteínas estructurales, mientras que

el citocromo c y otras enzimas dependen de la información nuclear para su síntesis⁵⁹ (Nass, 1969).

El ADN mitocondrial puede duplicarse por el mecanismo común descrito en el capítulo 19 y se comporta entonces como si fuese un cromosoma mitocondrial. Usando timidina- H^3 se ha observado su incorporación en mitocon-

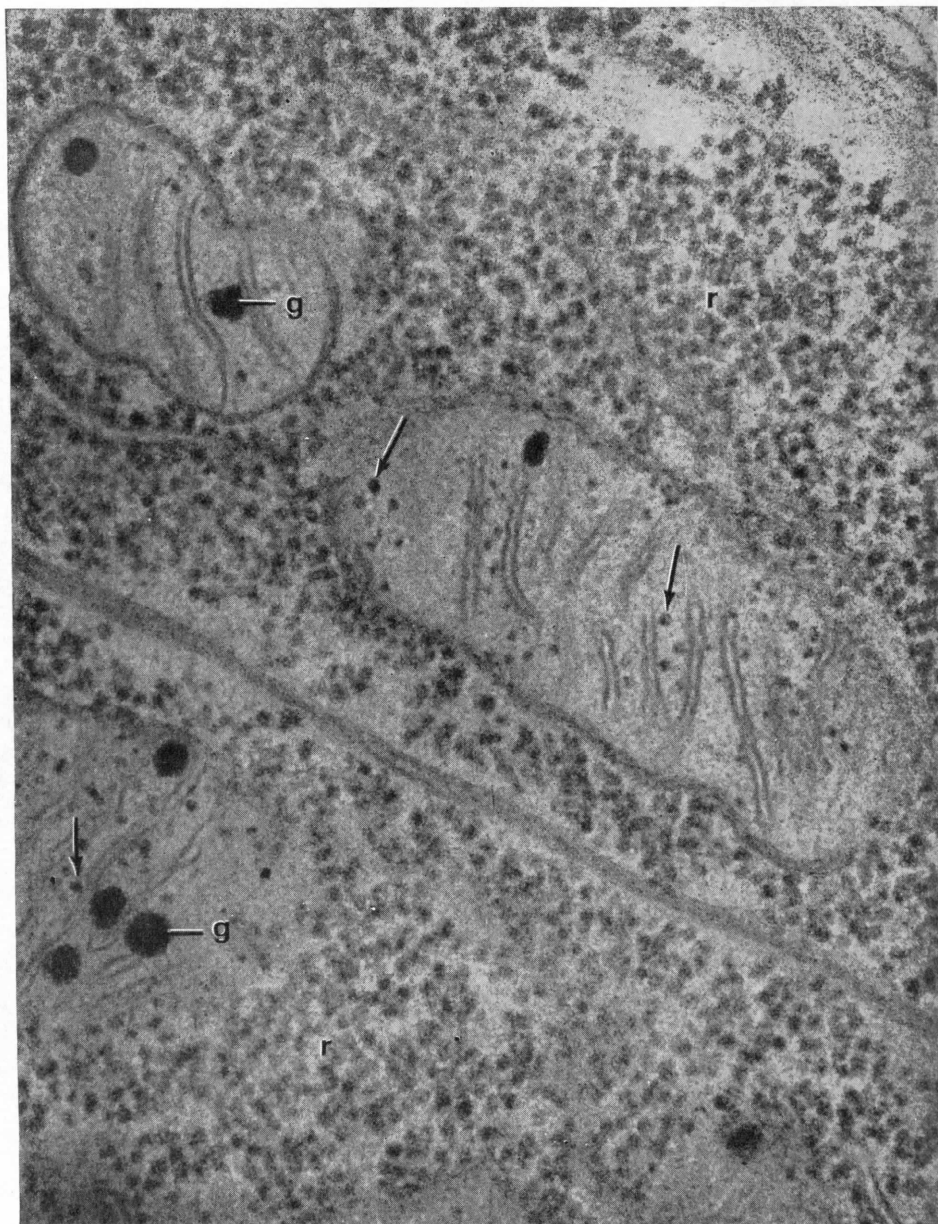


FIG. 11-20. Fotomicrografía electrónica del epitelio intestinal mostrando la gran acumulación de ribosomas (r) en el citoplasma. Dentro de las mitocondrias se observan gránulos densos, además de ribosomas (flechas). 95,000 $\times$. (Cortesía de G. E. Palade.)

drias de *Tetrahymena* (fig. 11-19). Este ADN no puede ser de origen nuclear, puesto que se duplica en un momento diferente del ciclo vital de la célula. Todas las mitocondrias incorporan timidina- H^3 en el período de duplicación del protozoario. Más aún, las mitocondrias poseen la ADN-polimerasa, enzima necesaria para la síntesis de ADN⁶¹ y que difiere de la ADN-polimerasa nuclear.⁶² En células en cultivo de tejidos sincronizado de estirpe humana, marcadas con timidina- H^3 , se encontró que el ADN mitocondrial era sintetizado durante la fase G_2 y que dicha síntesis se extendía hasta la citocinesis.⁶³

Síntesis proteica y ribosomas en las mitocondrias

Sólo recientemente ha sido probada en forma definitiva la incorporación de aminoácidos en proteínas por parte de las mitocondrias. Apparently estos organoides contienen toda la maquinaria necesaria para dicha función, como ocurre en el citoplasma (véase cap. 18). Uno de los problemas relacionados con este punto es el reconocimiento de verdaderos ribosomas dentro de la mitocondria. Aun cuando fueron puestos de manifiesto en muchos casos mediante microscopía electrónica (fig. 11-20), existen indicios más convincentes de su presencia en los cloroplastos.⁶⁴ Uno de los hallazgos de mayor interés es que estos ribosomas son más pequeños que los citoplásmicos y similares por tanto a los ribosomas bacterianos (tabla 18-1). Otra diferencia reside en la acción de ciertos inhibidores. Así, mientras la síntesis proteica mitocondrial es inhibida por el cloranfenicol (como ocurre con las bacterias), la síntesis proteica citoplásmica no se ve afectada por éste.

BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

Se han propuesto dos mecanismos para explicar la biogénesis mitocondrial: a) el organoide se origina *de novo* a partir de subunidades más pequeñas, y b) proviene de la división de mitocondrias progenitoras. En cultivos de tejidos, se distinguen a menudo mitocondrias en vías de fragmentación y también de fusión. Las mitocondrias se distribuyen entre las células hijas durante la mitosis, aumentando nuevamente su número en el período de interfase. Mediante cinematografía con cámara lenta, es posible verificar cómo las mitocondrias se alargan gradualmente y

luego se fragmentan en otras más pequeñas.⁵ Una información directa se obtuvo en *Neurospora*.^{65, 66} Después de marcar con colina radiactiva una mutante de *Neurospora* deficiente en colina, la aparición de radiactividad pudo seguirse en las mitocondrias hasta la segunda y tercera generación. Utilizando radioautografía, se comprobó que todas las mitocondrias de la progenie original estaban marcadas, lo mismo que las mitocondrias de cada célula hija, aunque en éstas existía la mitad de la radiactividad. Ello se interpretó como un índice de que las mitocondrias se habían dividido y crecido por la adición de nuevas moléculas de lecitina a las ya existentes en la estructura mitocondrial.

Las células de levadura cultivadas en anaerobiosis carecen de una cadena respiratoria completa (faltan los citocromos *a* y *b*) y no presentan las típicas mitocondrias cuando se las observa con el microscopio electrónico. Poseen solamente algunas membranas que contienen las dos deshidrogenasas primarias de la cadena respiratoria. Por la acción del oxígeno (poniendo nuevamente las células de levadura al aire) estas membranas se fusionan, se despliegan y forman verdaderas mitocondrias provistas de citocromos.⁶⁷

Ya hemos citado algunos detalles sobre la vida media de las membranas mitocondriales externa e interna, y la semejanza de la primera con la membrana del retículo endoplásmico. Otros experimentos en los que se usaron colina y leucina radiactivas demostraron que la membrana externa es más activa en la síntesis de fosfolípidos, mientras que en la interna predomina la síntesis proteica.³⁹ El hecho de que la membrana externa de la mitocondria esté relacionada con las otras membranas intracelulares, puede explicar muy bien las observaciones de varios autores referentes a la continuidad de las mitocondrias con la membrana nuclear, el retículo endoplásmico y, aun, con la membrana plasmática.^{68, 69}

Origen procariótico de las mitocondrias

Las hipótesis postuladas por los primeros citólogos sobre la posible asociación simbiótica entre las mitocondrias y las células superiores, vuelven a tener vigencia con los progresos modernos de la Biología celular y molecular. Las homologías entre las mitocondrias y las bacterias son múltiples, y consideradas desde el punto de vista evolutivo, pueden ser

más que circunstancias. Enumeraremos algunas de ellas:

1) Existen semejanzas en la *localización de la cadena respiratoria*. En las bacterias, el sistema de transporte electrónico se localiza en la membrana plasmática, que podría ser homologada a la membrana mitocondrial interna (fig. 1-3).

2) Ciertas bacterias poseen proyecciones membranosas de la membrana plasmática, formando los denominados *mesosomas*.⁷⁰ Esas proyecciones, comparables a las crestas mitocondriales, fueron separadas y se identificó en ellas la cadena respiratoria.⁷¹

3) La membrana externa de la mitocondria presenta similitudes con el retículo endoplásmico, lo cual indicaría que sólo la membrana mitocondrial interna y la matriz representan el simbiote original, y que éste ha sido envuelto con una membrana de origen celular.

4) El *ADN mitocondrial* es circular, como se encuentra frecuentemente en los cromosomas de procariontes. Se duplica y divide en varios círculos que pueden hallarse en una misma mitocondria.

5) La mitocondria contiene *ribosomas*, más pequeños que los citoplasmáticos y, por ende, más semejantes a los ribosomas bacteriales.

6) La *síntesis proteica* en la mitocondria y en las bacterias es inhibida por el cloranfenicol, mientras que la síntesis proteica extra-mitocondrial de la célula superior no es alterada.

Existen evidencias en mitocondrias de una síntesis de *ARN*, *ADN-dependiente*, lo cual indicaría una autonomía parcial de este orgánulo. Sin embargo, la cantidad de información transportada por el ADN mitocondrial es insuficiente para una biogénesis autónoma y las mitocondrias dependen del núcleo y del citoplasma con respecto a la síntesis de la mayor parte de sus constituyentes.

En la *teoría simbiótica*, la célula huésped se concibe como un organismo que obtiene energía a partir de la glucólisis —proceso que ocurre en la matriz citoplásmica (véase capítulo 5)—, mientras que el parásito posee el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, y es capaz de llevar a cabo la respiración y la fosforilación oxidativa. Esta hipótesis es aún más sugestiva en el caso de las células vegetales, puesto que en ellas el parásito sería el cloroplasto, es decir, un organismo autotrófico susceptible de absorber la energía luminosa.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Allman, D. W., Backman, E., Orme-Johnson, N., Tan, W. C. and Green, D. E.: (1968) Membrane system of mitochondria, VI membranes of liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125:981.
- Avron, M. and Chance, B.: (1966) Relation of phosphorylation to Electron Transport in isolated chloroplasts. *Brookhaven Symp. Biol.*, 19:149.
- Blondin, G. A. and Green, D. E.: (1967) The mechanism of mitochondrial swelling. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:(2):612.
- Hall, D. D. and Palmer, J. M.: (1969) Mitochondrial research today. *Nature*, 221:717.
- Lehninger, A. L.: (1962) Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.*, 42:467.
- Lehninger, A. L.: (1964) *The mitochondrion*. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Lehninger, A. L.: (1965) *Bionergetics*. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Lehninger, A. L.: (1967) Energy coupling in electron transport. Introduction. *Fed. Proc.*, 26:1333.
- Lehninger, A. L.: (1969) The mitochondrion: molecular organization. *First Int. Symp. Cell Biol. and Cytopharmacol.* Venice, July 7-11.
- Mitchell, P.: (1967) Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplast and bacteria: natural fuel cells and solar cells. *Fed. Proc.*, 26:1370.
- Nass, M. M. K.: (1969) Mitochondrial DNA. *J. molec. Biology*, 42:521, 529.
- Nass, M. M. K.: (1969) Mitochondrial DNA. *Science*, 165:25.
- Novikoff, A. B.: (1961) Mitochondria (chondriosomes). In: *The Cell*, vol. 2, p. 299. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Pressman, B. C.: (1969) Energy-linked transport in mitochondria. *First Int. Symp. Cell Biol. and Cytopharmacol.* Venice, July 7-11.
- Racker, E.: (1968) The membrane of the mitochondrion. *Scient. Amer.*, 218:32.
- Wagner, R. P.: (1969) Genetics and phenogenetics of Mitochondria. *Science*, 163:1026.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Hogeboom, G. H., Schneider, W. and Palade, G.: (1948) *J. biol. Chem.*, 172:619.
- Goodwin, T. W. and Lindberg, O.: (1961) Biological structure and function. *Proc. First IUB/IUBS Internat. Symp.*, vol. 2. Academic Press, New York.
- Lehninger, A. L.: (1962) *Physiol. Rev.*, 42:3, 467.
- Frédéric, J. and Chevremont, M.: (1953) *Arch. Biol. (Liège)*, 63:109.
- Frédéric, J.: (1958) *Arch. Biol. (Liège)*, 69:167.
- Loud, A. V.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:27.
- Shelton, E., Schneider, W. C. and Striebich, N. J.: (1953) *Exp. Cell Res.*, 4:32.
- Allard, G., de Lamirande, G. and Cantero, A.: (1952) *Cancer Res.*, 12:580.
- Allard, G., de Lamirande, G. and Cantero, A.: (1953) *Canad. J. Med. Sci.*, 30:543.
- Palade, G. E.: (1952) *Anat. Rec.*, 114:427.
- De Robertis, E. and Franco Raffo, H.: (1957) *Exp. Cell. Res.*, 12:66.

12. Peachey, L. D.: (1962) In: *Fifth Internat. Congress for Electron Microscopy*, vol. 2, p. 00-3. (Breese, S. S., Jr., ed.) Academic Press, New York.
13. Fleischer, S., Fleischer, B. and Stoeckenius, W.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:193.
14. Fernández Morán, H.: (1963) *Science*, 140:381.
15. Racker, F.: (1967) *Fed. Proc.*, 26:1335.
16. Slautterback, D.: (1965) *J. Cell Biol.*, 24:1.
17. Sabatini, D., De Robertis, E. and Bleichmar, H.: (1962) *Endocrinology*, 70:390.
18. Palade, G. E.: (1958) *Anat. Rec.*, 130:352.
19. De Robertis, E.: (1939) *Rev. Soc. argent. Biol.*, 15:94.
20. Bessis, M. and Breton-Gorius, J.: (1957) *C. R. Acad. Sci.*, 244:2846.
21. Carasso, N. and Favard, P.: (1958) *C. R. Acad. Sci.*, 246:1594.
22. Ward, R. T.: (1962) *J. Cell Biol.*, 14:309.
23. De Robertis, E. and Sabatini, D.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:667.
24. Hogeboom, G. H.: (1951) *Fed. Proc.*, 10:640.
25. Novikoff, A. B.: (1961) Mitochondria (condriosomes). In: *The cell*, vol. 2, p. 299. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
26. Mitchell, P.: (1966) *Biol. Rev.*, 41:445.
27. Chance, B. and Williams, G. R.: (1956) *Adv. Enzymol.*, 17:65.
28. Racker, E.: (1968) *Scient. Amer.*, 218:32.
29. Seligman, A. M., Karnowski, M. J., Wasserkug, H. L. and Hanker, J. S.: (1968) *J. Cell Biol.*, 38:1.
30. Levy, M., Toury, R. and André, J.: (1967) *Biochim. biophys. Acta*, 135:599.
31. Schnaitman, C. V., Erwin, and Greenwalt, J.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:719.
32. Sottocasa, G. L., Kuylenssterna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:415.
33. Parsons, D. F., Williams, G. R., Thomson, W. and Chance, B.: (1967) In: *Mitochondrial structure and compartmentation*. (E. Quagliariello et al., eds. Adriatica Editrice Bari, p. 5, 1967.)
34. Schnaitman, C. and Greenwalt, J. W.: (1968) *J. Cell Biol.*, 38:158.
35. Sottocasa, G. L. (1967) *Biochem. J.*, 105:1.
36. Flischer, S.: (1964) *Proc. 6th Internat. Congress Biochem.* New York, 8: Abstract S2.
37. Lehninger, A. L. (1968) *Excerpta Medica Int. Cong.*, Series 166:3.
38. Higgins, J. A. and Barnett, R. J.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:61a.
39. Bucher, T.: (1968) *Excerpta Medica Int. Cong.*, Series 166:5.
40. Chance, B. and Packer, L.: (1958) *Biochem. J.*, 68:295.
41. Packer, L.: (1963) *J. Cell Biol.*, 18:487.
42. Hackenbrock, C. R.: (1966) *J. Cell Biol.*, 30:269.
43. Hackenbrock, C. R.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:345.
44. Lehninger, A. L.: (1964) *The mitochondrion*. W. A. Benjamin Inc., New York.
45. Burgos, M. H.: (1967) *42nd Congress of PAMA*, Buenos Aires.
46. Packer, L.: (1961) *J. biol. Chem.*, 236:214.
47. Vasington, F. D. and Murphy, J. V.: (1962) *J. biol. Chem.*, 237:2670.
48. Greenwalt, J. W., Rossi, C. S. and Lehninger, A. L.: (1964) *J. Cell Biol.*, 23:21.
49. Thomas, R. S. and Greenwalt, J. W.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:55.
50. Rosse, C. S. and Lehninger, A. L.: (1963) *Biochem. J.*, 338:698.
51. Mitchell, P.: (1961) *Nature*, 191:144.
52. Nass, M. M. K. and Nass, S.: (1963) *J. Cell Biol.*, 19:593.
53. Sinclair, J. H. and Stevens, B.: (1966) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:508.
54. Kroon, A. M., Borst, P., van Bruggen, E. F. and Ruttenberg, G. J. C. M.: (1966) *Proc. Nat. (USA)*, 56:1836.
55. Sinclair, J. H. and Stevens, B. J.: (1966) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:508.
56. Sinclair, J. H., Stevens, B. J., Gross, N. and Rabinowitz, M.: (1967) *Biochim. biophys. Acta*, 145:528.
57. Darvid, I. B. and Wolstenholme, D. R.: (1967) *J. molec. Biol.*, 28:233.
58. Wolstenholme, D. R. and Darvid, I. B.: (1967) *Chromosoma*, 20:445.
59. Freeman, K. B., Haldar, D. and Work, T. S.: (1967) *Biochem. J.*, 105:947.
60. Parsons, J. A. and Rustad, R.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:683.
61. Parsons, P. and Simpson, M.: (1967) *Science*, 155:91.
62. Meyer, R. R. and Simpson, M. V.: (1968) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 61:130.
63. Koch, J. and Stokstad, E. L. R.: (1967) *Europ. J. Bioche.*, 3:1.
64. Stutz, E. and Noll, H.: (1967) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 57:774.
65. Luck, D. J. L.: (1963) *J. Cell Biol.*, 16:483.
66. Luck, D. J. L.: (1965) *J. Cell Biol.*, 24:461.
67. Linnane, A. W., Vitols, E. and Nowland, P. G.: (1962) *J. Cell Biol.*, 13:345.
68. Robertson, J. D.: (1961) Cell membrane and the origin of mitochondria. In: *Regional Neurochemistry*. (Kety, S. S. and Elkes, J., eds.) Pergamon Press, New York.
69. De Robertis, E. and Bleichmar, H. B.: (1962) *Zt. Zellforsch.*, 57:572.
70. Fitz-James, P. C.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 8:507.
71. Salton, M. R. J. and Chapman, J. A.: (1962) *J. Ultrastruc. Res.*, 6:489.

12

La célula vegetal

Cloroplasto: estructura y función

El plan general de organización celular es sumamente parecido en las células animales y en las vegetales. Las semejanzas que se refieren al núcleo, cromosomas y procesos mitóticos y meióticos, se estudiaron en los capítulos respectivos y se complementarán en los siguientes.

Aquí mencionaremos algunas características particulares de las células vegetales, en especial, la presencia de una pared celular gruesa que se encuentra por fuera de la membrana plasmática y de un tipo peculiar de organoide, los *plástidos*, relacionados con la síntesis y acumulación de diferentes sustancias. De ellos los más importantes son los cloroplastos que, junto con las mitocondrias, constituyen maquinarias bioquímicas susceptibles de producir transformaciones energéticas. En este caso, la energía electromagnética contenida en la luz es atrapada y convertida en energía química por medio del proceso de fotosíntesis. El lector encontrará en el cloroplasto un ejemplo aún más interesante que la mitocondria, en el que la integración de la estructura y función se lleva a cabo en el nivel molecular.

Pared celular

Una de las características de la estructura celular de los vegetales es la presencia de paredes rígidas que rodean y protegen a la membrana plasmática de la célula (fig. 2-4), las cuales configuran una especie de andamio que provee de sostén mecánico a los tejidos vegetales. Como se mencionó en el capítulo 1, la organización regular otorgada por estas gruesas paredes fue la primera estructura que Robert Hooke reconoció microscópicamente y que le sugirió el nombre de *célula*. En la constitución de las paredes celulares interviene

fundamentalmente la *celulosa* producida por la célula, pero las paredes adyacentes se hallan cementadas con *pectina*.

Las paredes celulares son muy complejas y están altamente diferenciadas en algunos tejidos. Además, se disponen conforme a una secuencia especial. De este modo pueden describirse paredes primarias, secundarias y terciarias, que se depositan en capas superpuestas durante el crecimiento y la diferenciación celular. Estos tres tipos de paredes celulares se distinguen por la disposición especial de las *microfibrillas*, que son los elementos constitutivos de la mayoría de las paredes celulares, y también por su composición química (fig. 12-1).

Tanto las *paredes primarias* como las *secundarias* están compuestas principalmente por celulosa, a la cual se pueden incorporar sin embargo otros materiales. Por ejemplo, a la pared primaria se le agregan lignina o suberina y, en las células epidérmicas, cutina y ciertas ceras cuticulares, que constituyen sobre la superficie una cubierta impermeable tendiente a reducir la pérdida de agua. En muchos hongos y levaduras, la pared celular está formada por *quitina*, un polímero de la glucosamina. Otras sustancias halladas en la pared celular, además de la celulosa, se indican en la tabla 12-1, que incluye algunos datos acerca de la composición química y reacciones de coloración.

La pared terciaria se deposita, en algunos tejidos, en el interior de la pared secundaria y posee una estructura especial así como diferentes propiedades químicas y tintoriales. Está compuesta fundamentalmente por xilosa en vez de celulosa.

El proceso de adosamiento de las diversas paredes se debe considerar en el trascurso

del crecimiento y diferenciación de la célula. Durante el crecimiento, las partes más externas y viejas de la pared celular están sujetas a estiramientos intensos debido a los procesos de reorientación y aun de ruptura que ocurren en las microfibrillas. De este modo pueden producirse algunos de los fenómenos de

desgarramiento, de inclinación y crecimiento en mosaico, etcétera.¹ La pared celular determina en gran medida la forma de la célula y es usada principalmente como un criterio para la clasificación de los tejidos vegetales en parénquima, colénquima, fibras, etcétera, cuya consideración excede los límites de este libro.²

TABLA 12-1. Sustancias de la pared celular

<i>Sustancia</i>	<i>Unidad química</i>	<i>Reacción tintórea</i>
Celulosa.	Glucosa.	Cloro - zinc - yodo (tíñe de violeta)
Hemicelulosa.	Arabinosa, xilosa, manosa, galactosa.	No específicas.
Sustancias pectínicas.	Ácidos glucurónico y galacturónico.	Rojo de rutenio.
Lignina.	Alcohol coniferílico.	Hidrocloreto de floriglucinol (tíñe de color rosado).
Sustancias cuticulares.	Ácidos grasos.	Cloro - zinc - yodo (tíñe de amarillo).
Depósitos minerales.	Calcio y magnesio en forma de carbonatos y silicatos.	Sudán III (tíñe de color naranja).

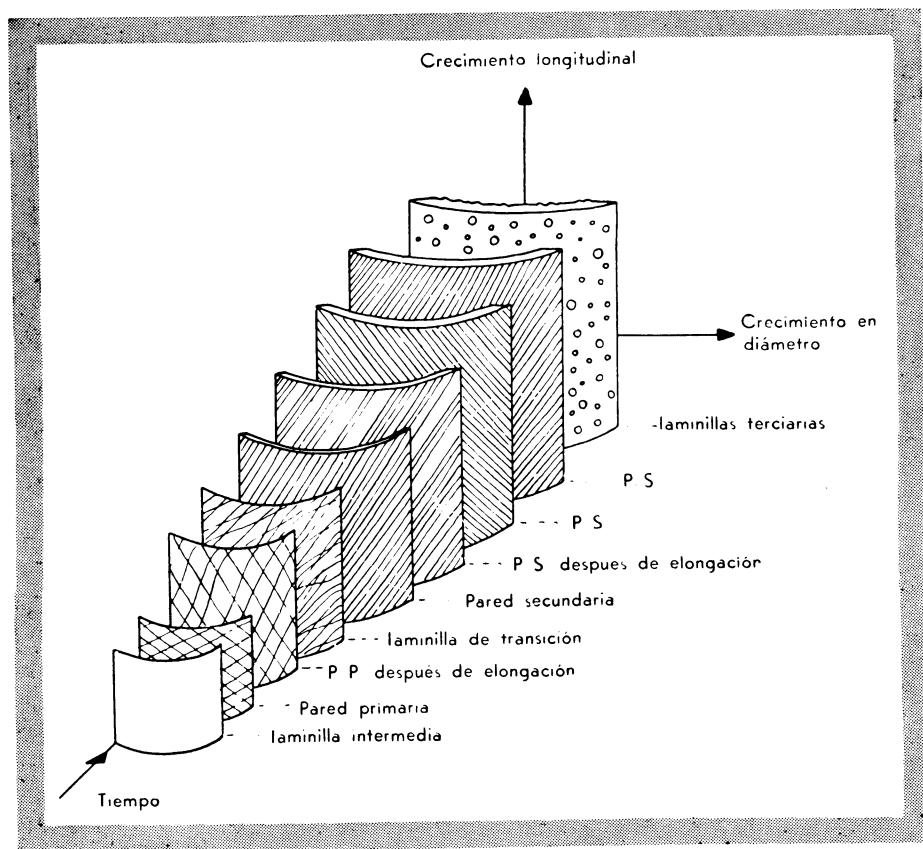


FIG. 12-1. Esquema que ilustra la secuencia en la formación de los diversos tipos de capas de la pared celular. Véase la disposición de las fibrillas y demás estructuras en las diferentes membranas. (De D. K. Mühlethaler.)

La pared celular constituye un producto del citoplasma y su desarrollo comienza con la aparición del fragmoblasto o placa celular, inmediatamente después de la división celular. La pared celular primaria está compuesta esencialmente por microfibrillas de celulosa que pueden orientarse en todas direcciones dentro del plano de la pared, formando un retículo laxo que contiene grandes cantidades de agua y componentes no celulósicos. Se admite que el crecimiento de ambas paredes celulares tiene lugar por aposición. No obstante, la pared secundaria se diferencia porque las microfibrillas son paralelas y se encuentran más densamente agrupadas¹ (figura 12-1).

En la figura 12-2 se indican de manera esquemática los elementos estructurales de la celulosa en el nivel molecular. Las microfibrillas, visibles con el microscopio óptico, están compuestas por microfibrillas de unos 250 Å de diámetro, las que a su vez se hallan constituidas por cerca de 2000 cadenas de celulosa. Alrededor de 100 de estas cadenas están unidas entre sí en fibrillas elementales (o micelas), en las cuales existe una organización molecular cristalina. Por difracción de rayos X, la celulosa da un patrón cristalino con un período de repetición de 10.3 Å a lo

largo del eje, que corresponde a una unidad de celobiosa formada por dos de β -glucosa.

Plasmodesmos: continuidad de los citoplasmas celulares^{1, 3}

La figura 2-4 ilustra una célula promeristemática del extremo de la raíz, observada con pequeño aumento mediante el microscopio electrónico. La pared celular primaria se ve claramente y separa a la célula de las seis adyacentes. Esa separación no es completa y en varios puntos de la pared celular se distinguen puentes de material celular a través de la brecha, denominados *plasmodesmos*. De acuerdo con los conceptos clásicos en Citología, estos canalículos situados en el espesor de la membrana pectocelulósica contienen expansiones celulares que penetran y se ponen en contacto, pero sin fusionarse. Conforme a esta interpretación, las distintas células vegetales serían completamente autónomas. Los estudios con microscopia electrónica realizados en diversas células meristemáticas indican, por el contrario, que en el interior de los plasmodesmos hay una continuidad de la fina membrana plasmática de una célula con la adyacente y que los citoplasmas pueden estar en comunicación. Se ha observado que

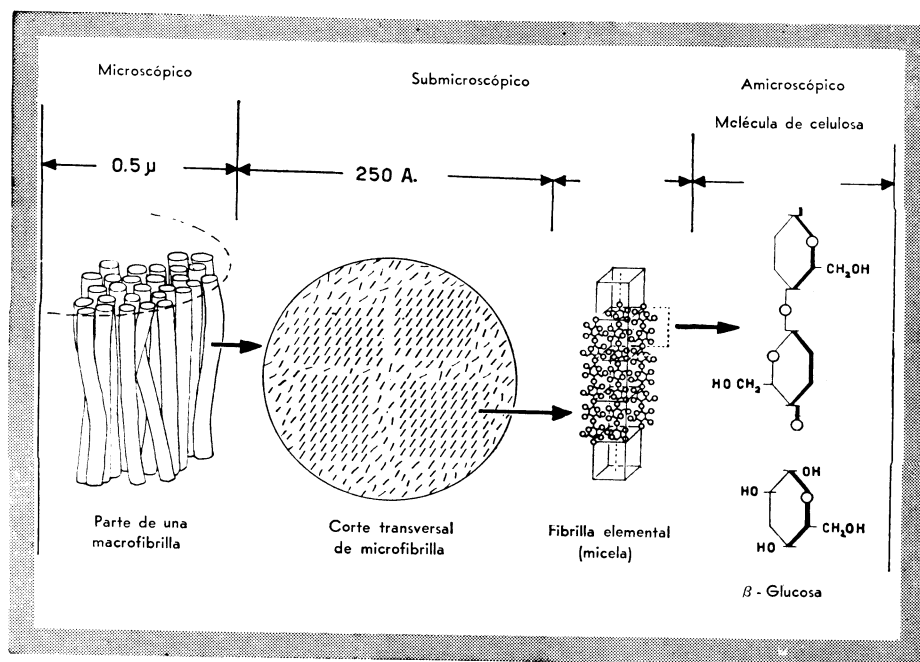


FIG. 12-2. Elementos estructurales de la celulosa en los distintos niveles de organización. (De D. K. Mühlethaler.)

dentro de los plasmodesmos existen túbulos, en conexión con las vacuolas o cisternas del sistema vacuolar citoplásmico (retículo endoplásmico; fig. 12-3). Dichos túbulos están relacionados probablemente con la circulación de líquido entre las células, el que contiene productos nutritivos, gases disueltos, iones y otras sustancias. La presencia de los plasmodesmos permite la libre circulación de líquidos, tan importantes para mantener la tonicidad de la célula vegetal, y posiblemente también el pasaje de solutos y aun de macromoléculas. Según estos conceptos, las paredes celulares no representan tabiques completos entre las células, sino que éstas constituyen un vasto sincicio encuadrado por el esqueleto que le forman las membranas pectocelulósicas.

Es interesante destacar que los plasmodesmos se originan aparentemente en una época

muy temprana, junto con la formación del fragmoplasto, que aparece durante la telofase en el ecuador de las células en división (véase capítulo 14).

Matriz citoplásmica. Sistema vacuolar

En el capítulo 2 se mencionaron las semejanzas esenciales que existen entre los citoplasmas de células animales y vegetales.^{4, 5} En las células meristemáticas, las membranas del sistema vacuolar citoplásmico son relativamente escasas y se observan mejor después de la fijación en permanganato (fig. 12-4). Con este tratamiento la mayoría de los ribosomas desaparecen o son invisibles. Cuando la célula se fija en tetróxido de osmio, el sistema vacuolar es enmascarado por los numerosos ribosomas que llenan la *matriz cito-*

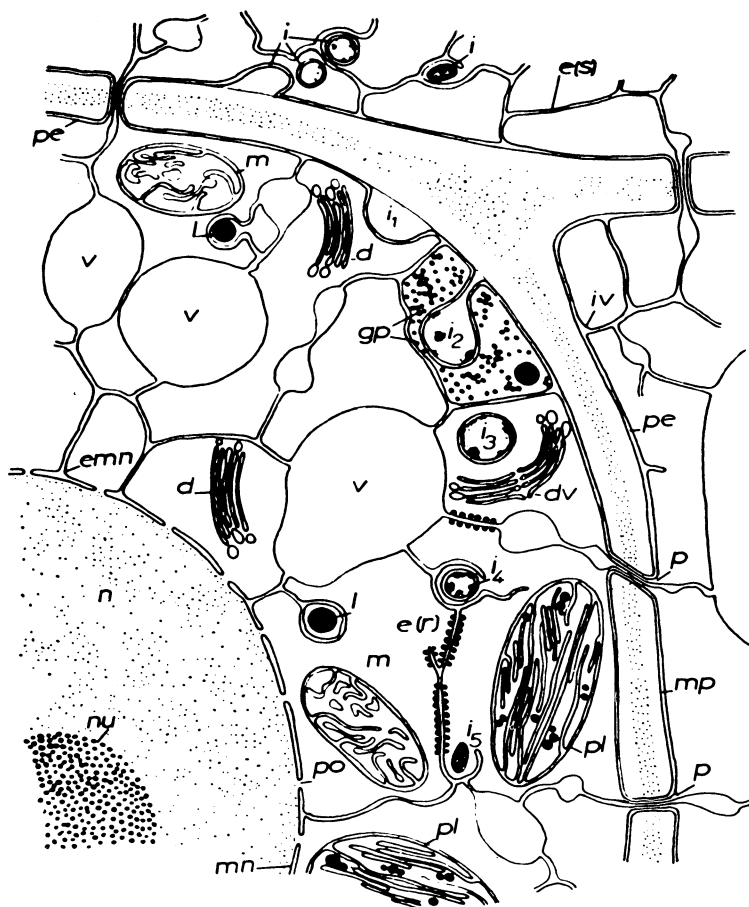


FIG. 12-3. Esquema interpretando la ultraestructura de la célula vegetal y sus relaciones intercelulares. (Cortesía de Buvat.)

plásmica. En efecto, en células indiferenciadas la mayoría de estas partículas no se hallan adheridas a las membranas, encontrándose libres en la matriz.

Si se fijan células meristemáticas en glutaraldehído es posible observar, por debajo de la membrana celular, un sistema de *microtúbulos* (véase cap. 22) orientados tangencialmente con respecto a la superficie celular. Dichas estructuras son en apariencia muy lábiles y no pudieron ser preservadas con otros fijadores. Este componente de la matriz celular está compuesto por elementos tubulares no ramificados de 250 Å de diámetro y varios micrones de longitud,⁸ a los que se les atribuye un posible papel en la formación de la pared celular. Los microtúbulos se encuentran en las zonas de citoplasma subyacentes a los sitios donde se deposita la pared secundaria, en forma espiral o reticular.^{9, 10}

El retículo endoplásmico cumpliría funciones semejantes a las que desempeña en la célula animal (véase cap. 10). Por ejemplo, en células de la raíz del rábano se comprobó la secreción de material proteico dentro de las cisternas dilatadas.¹¹

El sistema vacuolar se desarrolla cada vez más con la diferenciación de la célula. En los esbozos de las hojas se ha observado un retículo endoplásmico granular y agranular. Las células más diferenciadas evidencian menos ribosomas y el sistema vacuolar tiene grandes vacuolas llenas de líquido.

En el esquema de la figura 12-3 se indican las posibles conexiones del sistema con la membrana nuclear y la membrana plasmática. Se ha conjeturado que la membrana plasmática de la célula vegetal puede experimentar una invaginación y un proceso activo de penetración de líquido (pinocitosis), como ocurre en numerosas células animales.¹²

El gran desarrollo del sistema vacuolar durante la diferenciación celular se relaciona con la intensa hidratación del citoplasma. Este proceso puede dar lugar a enormes vacuolas que se llenan de líquido y que son susceptibles de confluir entre sí. Como resultado, el citoplasma queda comprimido en una fina capa contra la membrana celular y se aprecian movimientos citoplásmicos, también denominados de *ciclosis* (véase cap. 22).

Complejo de Golgi. Dictiosomas

En las células vegetales fue discutida por los primeros citólogos^{13, 14} la existencia de un complejo de Golgi, pero sólo con el adveni-

miento del microscopio electrónico fue posible confirmarla. En efecto, por medio de las técnicas usuales de coloración los resultados no eran concluyentes. La demostración de la estructura del complejo de Golgi en las células animales con el microscopio electrónico proporcionó la base para el descubrimiento de este componente en las células vegetales. Lo mismo que en los invertebrados, el complejo de Golgi aparece en los vegetales como cuerpos separados y dispersos por todo el citoplasma: los denominados *dictiosomas* o *golgiosomas* (fig. 12-4). Tienen forma de placas arqueadas y un tamaño igual o menor que una mitocondria. La estructura fina es muy típica y consiste en una fila de vesículas o cisternas aplanadas, ligeramente dilatadas en los bordes. Rodeando las cisternas hay vesículas que parecen formarse por dilataciones localizadas y que probablemente constituyen un producto de la actividad del dictiosoma.

Los dictiosomas están dispersos por todo el citoplasma sin tener una polarización definida. En la telofase, se agrupan en la periferia de la placa celular y dan lugar a pequeñas vesículas que se fusionan para formar la placa (fig. 12-4 y 12-5). En ciertos estadios aparece una secreción característica dentro de ellas. Después de una lesión mecánica se producen gran número de pequeñas vesículas.¹⁵ Como en las células animales, el complejo de Golgi de algunas células vegetales (por ejemplo, células del capuchón de la raíz del maíz) se halla en relación directa con la secreción. Las cisternas del Golgi se llenan con los productos de secreción, los cuales después se concentran y se descargan.¹⁶

Los dictiosomas y sus vesículas asociadas son muy abundantes en células que sintetizan mucílago y en las de la capa radicular externa del poroto. Este mucílago es sintetizado a expensas de los cuerpos amiláceos presentes en los plástidos.¹⁷

Mitocondrias

Las mitocondrias de las células vegetales poseen una estructura esencialmente similar a la de las células animales. En los meristemas tienen relativamente pocas crestas y una matriz abundante. Durante la diferenciación esta estructura interna puede variar. En las células encargadas de la fotosíntesis (hojas) se

manifiesta un aumento de las crestas mitocondriales, mientras que en aquellas que contienen gránulos de almidón (amiloplastos) las mitocondrias permanecen indiferenciadas como en el meristema (fig. 12-6,A).

Uno de los puntos importantes en discusión es la relación entre las mitocondrias y

los cloroplastos. Guillermond¹⁸ postuló que en las etapas tempranas los meristemas de las hojas tienen dos tipos de organoides: uno constituido por mitocondrias cortas y el otro por cuerpos filamentosos alargados. Estos últimos aumentan de espesor y pueden dar lugar a vesículas, gránulos de almidón o cloro-

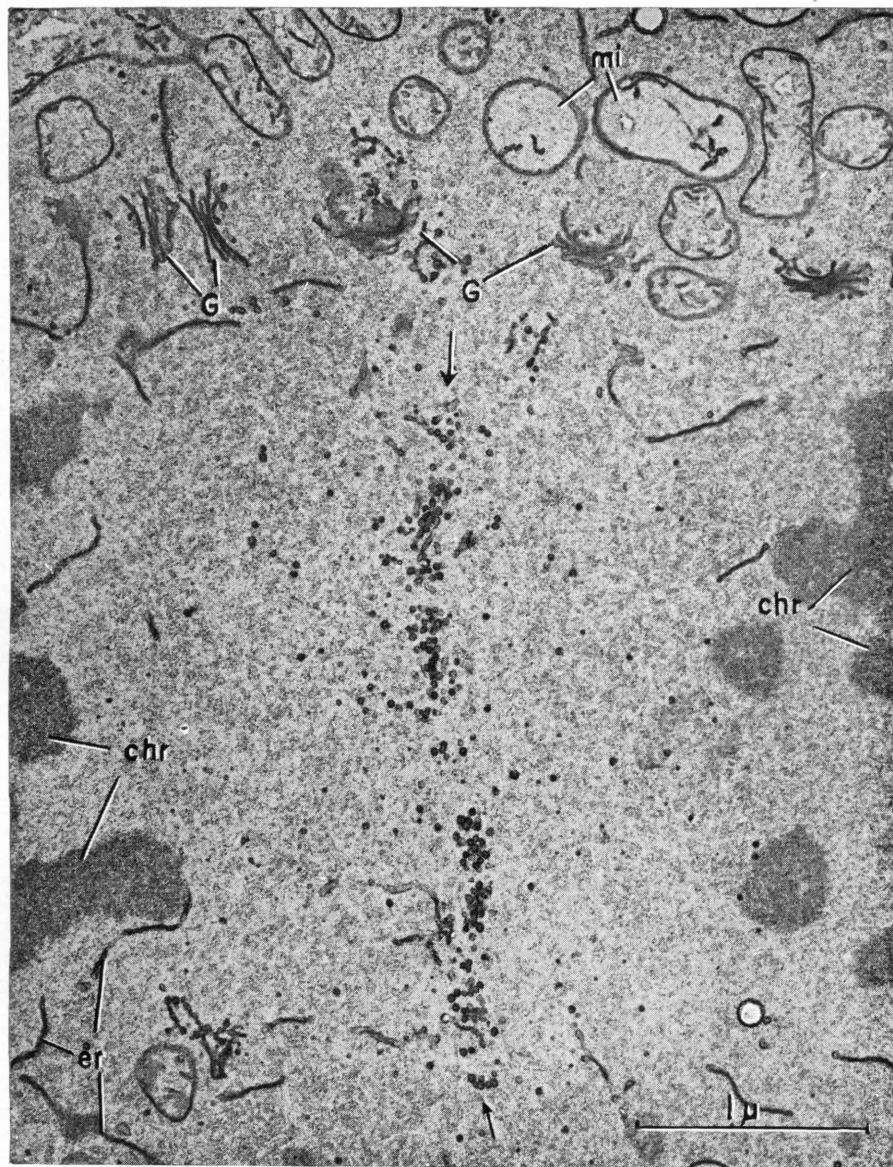


FIG. 12-4. Fotomicrografía electrónica de células de la raíz de *Zea mays* durante la telofase. Esta región corresponde a la placa celular. Véanse en la parte superior las mitocondrias marginales (mi) y los golgiosomas (G) (dictiosomas). Entre flechas se disponen las vesículas para formar la placa celular primaria. chr, cromosomas telofásicos en las dos células hijas; er, retículo endoplásmico. 45,000 $\times$. (Cortesía de W. Gordon Whaley y H. H. Mollenhauer.)

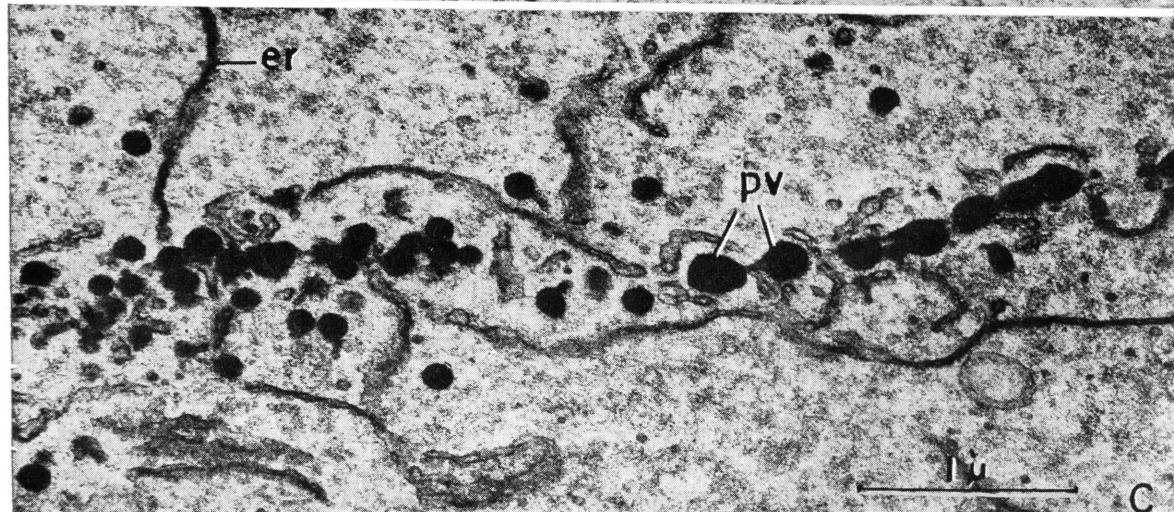
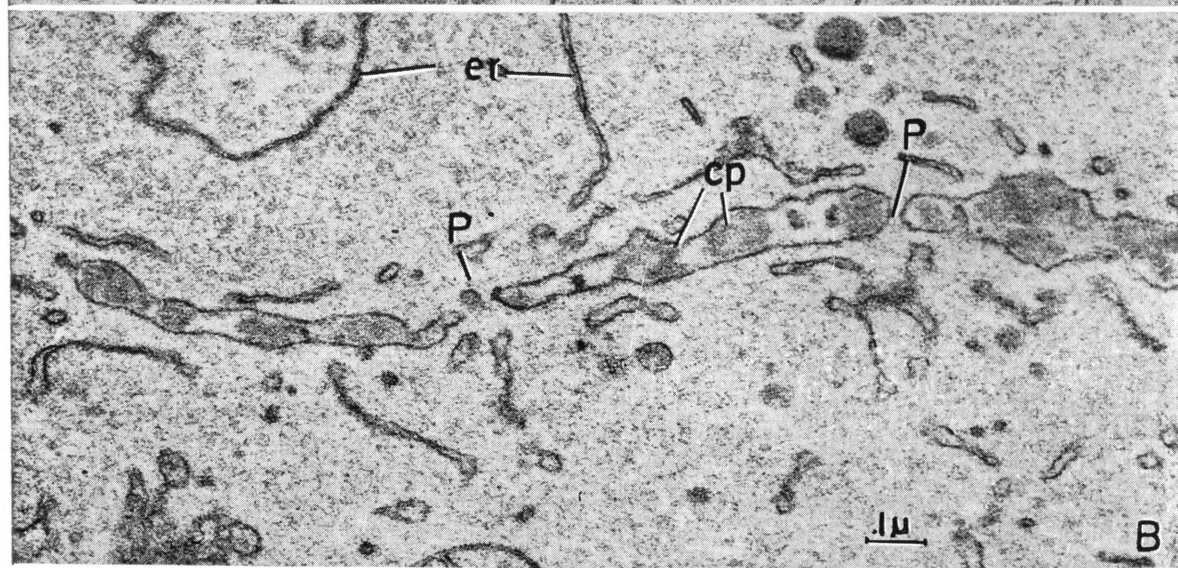
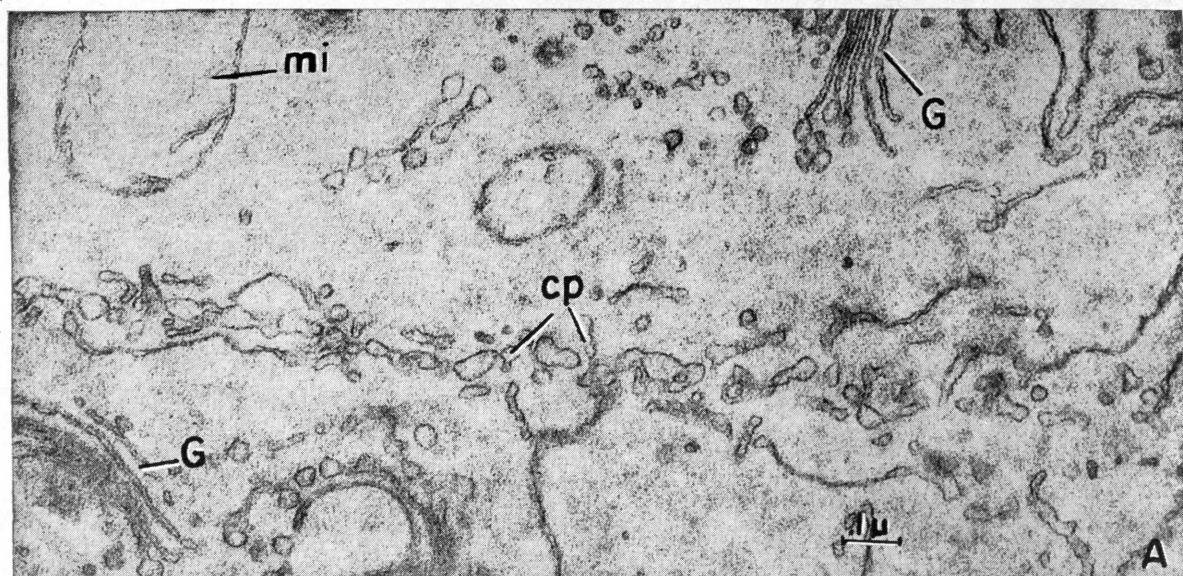


FIG. 12-5. Fotomicrografías electrónicas de raíz de *Zea mays* en las que se representan tres etapas en el desarrollo de la placa celular durante la telofase. cp, Vesículas de la placa celular; P, futuros plasmodesmos; pv, vesículas de pectina; er, retículo endoplásmico; G, golgiomas; mi, mitocondrias. A, 80,000 $\times$; C, 30,000 $\times$. (Cortesía de W. Gordon Whaley y H. H. Mollenhauer.)

plastos, en tanto que las mitocondrias cortas permanecen sin modificarse. De acuerdo con esta opinión, ambos tipos de organoides son independientes.

Por medio de estudios efectuados con el microscopio electrónico se confirmó ese punto de vista. Los plástidos primitivos —también denominados *protoplástidos*—, aunque se asemejan en algo a las mitocondrias, difieren de ellas por el menor número de proyecciones de su membrana interna, su mayor tamaño y la presencia de gránulos densos en el interior (fig. 12-6, A).

PLÁSTIDOS: CLOROPLASTOS

Los plástidos son organoides citoplásmicos íntimamente relacionados con los procesos metabólicos de las células vegetales. Se encuentran en todo el reino vegetal, con la posible excepción de las bacterias, ciertas algas, mixomicetes y hongos. Están caracterizados por la presencia de pigmentos, como la clorofila y los carotenoides, y por la capacidad de sintetizar y acumular sustancias de reserva, como el almidón, aceites y proteínas.

En las células sexuales embrionarias exis-

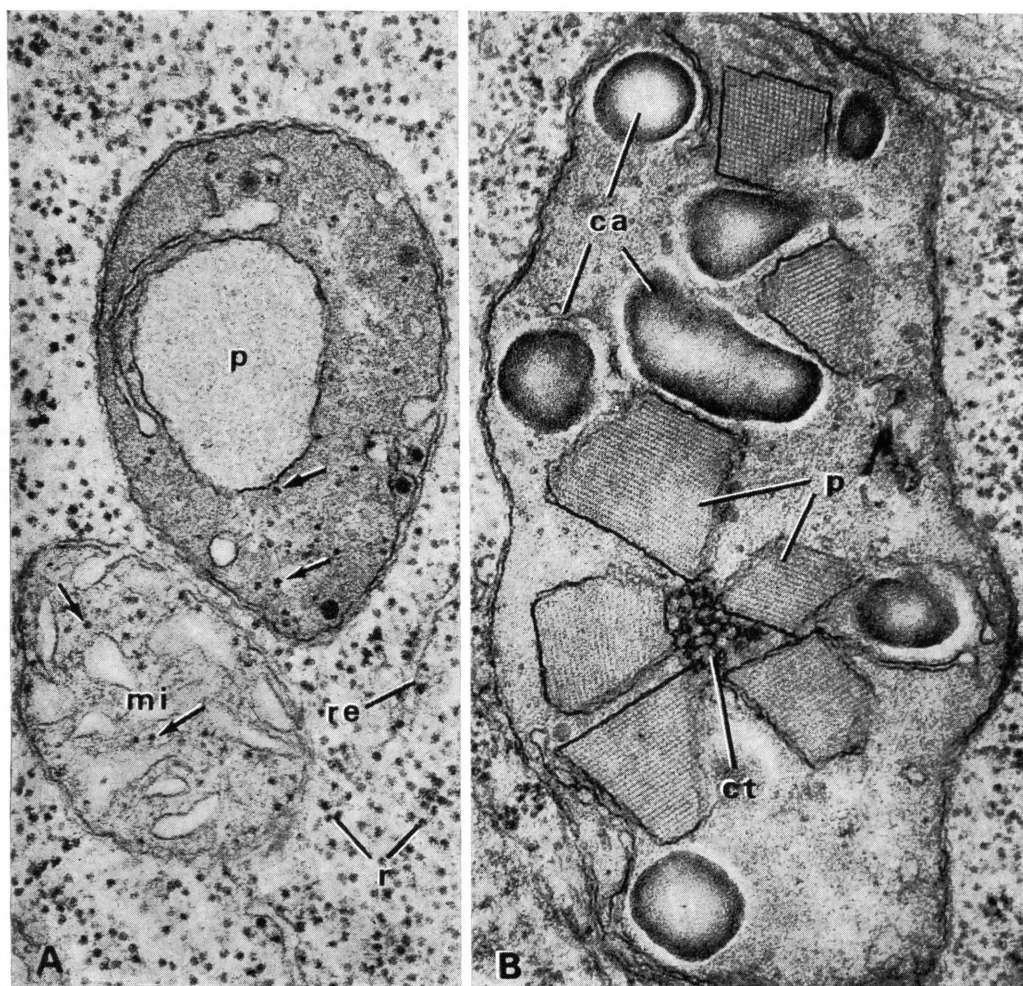


FIG. 12-6. Fotomicrografías electrónicas de plástidos de la raíz del poroto. A En una célula meristemática se observa un plástido joven y una mitocondria. El plástido contiene una inclusión de proteína (p). El estroma es denso y posee gránulos y ribosomas (flechas). La mitocondria también presenta ribosomas (flechas), y muchos más se encuentran en el citoplasma (r). re, Reticulo endoplásmico. B Imagen de un plástido con varios cristales de proteína (p) y cuerpos de almidón (ca). Cerca del centro hay un sistema de túbulos, denominado complejo tubular (ct). 77,000 X. (Cortesía de E. H. Newcomb.)

ten plástidos incoloros en forma de bastones o esferas (leucoplastos). Durante el desarrollo embrionario, en ciertas zonas diferenciadas de la raíz, los leucoplastos elaboraron granos de almidón (fig. 12-6, B) y se transforman en amiloplastos.

Éstos se distinguen con el microscopio de polarización por su característica birrefringencia, o por medio de reacciones histoquímicas para el almidón. También se hallan leucoplastos en células meristemáticas y en las regiones de la planta que no reciben luz.

Los plástidos localizados en los cotiledones y en los esbozos foliares del tallo son al principio incoloros, pero luego comienza a contenerse en ellos la clorofila y adquieren el color verde característico de los cloroplastos.

Además de los cloroplastos hay otros plástidos coloreados, que se agrupan con la denominación de *cromoplastos*. Por ejemplo, el color rojo del tomate maduro se debe a la presencia de cromoplastos, cuyo pigmento rojo (licopeno) pertenece al grupo de los carotenoides. En las algas se encuentran cromoplastos que contienen pigmentos diversos (como la ficoeritrina y ficocianina).

La figura 12-7 establece las relaciones presumibles entre los diferentes tipos de plástidos, debiendo destacarse que no han sido totalmente probadas. En un estudio reciente se determinó, por microscopía electrónica, que en células del extremo de la raíz de *Phaseolus vulgaris* L. (poroto) un mismo leucoplasto puede acumular almidón y proteína, y podría ser calificado por tanto como "amiloplasto" o como "proteinoplasto", de acuerdo con la nomenclatura mencionada (fig. 12-6, B). Es interesante señalar que los gránulos de almi-

dón se depositan en la matriz o estroma del plástido, mientras que la proteína, algunas veces con disposición cristalina, lo hace dentro de sacos limitados por membranas. También se encuentran en el estroma probables ribosomas, láminas, gránulos de fitoferritina y un complejo tubular originado por invaginación de la membrana interna del plástido.¹⁹ Como se mencionará más adelante, el complejo tubular se asemeja al *cuerpo prolamelar*, que se halla en cloroplastos sometidos a la oscuridad. El primero, en cambio es insensible a la luz.

Cloroplastos

Aquí consideraremos principalmente a los cloroplastos, que son los plástidos más frecuentes y los de mayor importancia biológica, puesto que por medio de la fotosíntesis producen gran parte de la energía química aprovechada por los organismos vivientes. Sin los cloroplastos no existirían vegetales ni animales, ya que estos últimos se nutren del material elaborado por los primeros.

Morfología

La forma, tamaño y distribución de los cloroplastos varían en las diferentes células y con las especies, pero dentro del mismo tejido son relativamente constantes.

En las hojas de las plantas superiores, cada célula contiene un número considerable de cloroplastos de forma esférica, ovoide o discoide. A veces tienen forma de clava con la parte media delgada y los extremos gruesos llenos de clorofila. Otros, como los del *Lilium*

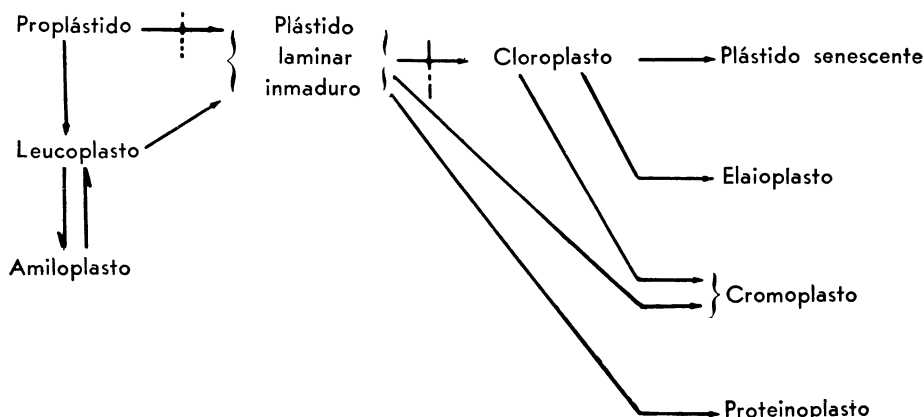


FIG. 12-7. Esquema que indica las relaciones entre los tipos de plástidos. Los plástidos que envejecen se encuentran en las hojas de otoño. (De S. Granick.)

candidum, aparecen rodeados de una corteza incolora. Son frecuentemente vesiculosos, con un centro incoloro. La presencia de gránulos de almidón se determina por la característica reacción azul con el reactivo de yodo. Las algas poseen a menudo un solo cloroplasto

muy voluminoso que se visualiza como un retículo, una cinta espiral o una placa radiada (fig. 12-8). El número de cloroplastos se mantiene relativamente constante en los diversos vegetales. En plantas superiores existen entre 20 y 40 por célula.



FIG. 12-8. Fotomicrografía electrónica de *Chlamydomonas* que muestra el enorme cloroplasto con los grana (g) y el pirenoide (p). d, Dictiosoma; mb, membrana plasmática; pc, pared celular; f, flagelo; n, núcleo. 8000 $\times$. (Cortesía de G. E. Palade.)

En la hoja del *Ricinus communis* se ha calculado que hay alrededor de 400,000 cloroplastos por milímetro cuadrado de superficie. Si su número es insuficiente, aumentan por división; cuando es excesivo, se reducen por degeneración.

El tamaño varía considerablemente, pero en las plantas superiores puede establecerse, como término medio, un diámetro de 4 a 6 μ . Este es más bien constante para un tipo celular dado, pero se hallaron diferencias sexuales y genéticas. Por ejemplo, el tamaño es mucho mayor en las células poliploides que en las correspondientes diploides. En general, se puede decir que en las plantas que crecen en la sombra, los cloroplastos son mayores y más ricos en clorofila.

En ocasiones, los cloroplastos están distribuidos en forma homogénea dentro del citoplasma, pero frecuentemente se encuentran agrupados cerca del núcleo o contiguos a la pared celular. La *distribución* y orientación varían de acuerdo con la energía luminosa.

En las hojas en crecimiento se multiplican aparentemente por división, produciéndose el alargamiento del plástido y su constricción en la parte central. Se ha calculado en unos ocho días el tiempo total de división del cloroplasto.

La observación de células epidérmicas vivientes de las hojas de *Iris* y otras especies ha demostrado que los cloroplastos experimentan desplazamientos y deformaciones por la acción de la corriente citoplásmica o ciclo-sis. Además de esta *motilidad pasiva*, se comprobaron movimientos activos de tipo ameboide o contráctil, que a menudo están relacionados con el grado de iluminación.

En cloroplastos aislados de espinaca se han verificado cambios de forma y volumen por acción de la luz. El volumen disminuye notablemente algún tiempo después que son iluminados y comienza la fosforilación; este efecto es reversible.²¹ En la oscuridad, se puede inducir la contracción del cloroplasto mediante la adición de ATP,²² y se han identificado dos proteínas con propiedades contráctiles en cloroplastos aislados.

Los cloroplastos se distinguen de las mitocondrias y otros plástidos por su mayor resistencia a las diferentes presiones osmóticas y a los fijadores.

Los cloroplastos poseen agentes fuertemente reductores, debido a lo cual pueden reducir instantáneamente el nitrato de plata en la

oscuridad. Esta propiedad se vincula con la fotosíntesis.

Los cloroplastos poseen mayor densidad que el citoplasma y van hacia el polo centrífugo. Cuando se los coloca en agua destilada se hinchan y toman un aspecto granular. En una solución de sacarosa su tamaño y morfología permanecen invariables. Estas características están relacionadas con la existencia de una membrana que los rodea y que posee propiedades osmóticas.

Composición química

Los cloroplastos, como las mitocondrias, pueden aislarse por centrifugación diferencial después de la homogeneización de la célula mediante procedimientos especiales. La tabla 12-2 muestra la composición química aproximada de cloroplastos aislados de vegetales superiores.

Alrededor del 80 por ciento de las proteínas son insolubles y están íntimamente unidas a los lípidos, para constituir lipoproteínas.

Ha sido aislada una proteína estructural que, en ciertas condiciones, forma complejos 1:1 con la clorofila. Esta proteína representa alrededor del 40 por ciento del contenido proteico total.²⁴ Una parte importante del resto la constituyen las enzimas de los cloroplastos, que pueden ser solubles o formar parte de la estructura. La fracción lipídica comprende grasas neutras, esteroides, ceras y fosfolípidos (tabla 12-2).

Uno de los componentes principales es la *clorofila*, molécula asimétrica constituida por una cabeza hidrofílica, a la que integran cuatro núcleos pirrólicos dispuestos alrededor de un átomo de magnesio, y una larga cola formada por una cadena hidrófoba (cadena fitol).

Es interesante recordar que la clorofila es una porfirina similar a la que se encuentra en varios pigmentos animales como la hemoglobina y los citocromos. En este caso, el hierro reemplaza al magnesio.

Los otros pigmentos, que pertenecen al grupo de los *carotenoides*, están ocultos por el color verde de la clorofila. En el otoño, disminuye la clorofila y aquéllos se ponen de manifiesto. A los carotenoides pertenecen los carotenos y las xantófilas, que están relacionados con la vitamina A. Los carotenos se caracterizan químicamente por tener una cadena corta de hidrocarburo no saturado, que los hace completamente hidrófobos. En cam-

bio, las xantófilas poseen varios grupos hidroxilos.

Se ha encontrado ácido ribonucleico (ARN) en una proporción que oscila entre el 3 y 4 por ciento del peso seco. En *Chlamydomonas* (fig. 12-8), se observó dentro de los cloroplastos cuerpos que poseen una reacción Feulgen positiva, típica del ácido desoxirribonucleico (ADN).²⁵ Dichos cuerpos desaparecen después del tratamiento con desoxirribonucleasa. Se ha relacionado el ADN de estos cloroplastos con la presencia de un sistema genético especial no-cromosómico (herencia citoplásmica).²⁶ Los cloroplastos poseen también algunos citocromos, vitaminas K y E, y diferentes átomos metálicos (Fe, Cu, Mn, Zn).

Algunas de las enzimas serán consideradas más adelante junto con la función de los cloroplastos.

Ultraestructura de los cloroplastos y de los grana

Se ha establecido sin ninguna duda que en muchos cloroplastos existe una estructura heterogénea constituida por pequeños gránulos, denominados *grana*, incluidos dentro del estroma. Estos *grana* han sido identificados en numerosas plantas criptógamas y fanerógamas. Al principio se los pudo fotografiar *in vivo* con luz roja en plantas acuáticas transparentes, pero luego se los observó en otras especies, tanto *in vivo* como después de la fijación. El tamaño de los *grana* varía entre 0.3 y 1.7 μ , según las especies. Cuanto más pequeños, dentro de la visibilidad del microscopio, más numerosos son.

Se los describe como cuerpos aplanados, con forma de plaquetas o discos, de manera que en vista lateral aparecen a modo de bandas densas paralelas a la superficie del cloroplasto (fig. 12-9, A).

Además del microscopio electrónico, en el estudio de la organización molecular del cloroplasto se han empleado diversos métodos indirectos. Tanto el cloroplasto como la clorofila disuelta en una solución de alcohol o acetona poseen una fluorescencia roja. Sin embargo, la clorofila en suspensiones coloidales en agua no es fluorescente. Por otra parte, la fluorescencia persiste si la clorofila es absorbida formando una capa molecular. Estos hechos condujeron a la interpretación de que dentro de los plástidos la clorofila se dispone en capas monomoleculares.

Los cloroplastos lameliformes de ciertas algas, como *Spirogyra*, *Mougeotia*, etcétera, son birrefringentes en cortes trasversales o longitudinales y cuando se los ve desde arriba.

Los cortes finos observados con el microscopio electrónico muestran en los cloroplastos la presencia de una doble membrana limitante externa. La estructura interna varía considerablemente si se consideran las algas (fig. 12-8) o los vegetales superiores. En ambos casos la estructura básica está compuesta por finas membranas más o menos continuas que, en las algas verdes, forman sacos aplanados o discos sin *grana*, y en los vegetales superiores, *grana* unidos por membranas o túbulos. Además existe una matriz de baja densidad dentro de la cual se encuentran las membranas y, en algunos casos, gránulos

TABLA 12-2. Análisis aproximado de los cloroplastos de vegetales superiores (Según S. Granick)

Constituyente	Porcentaje de peso seco	Componentes (Porcentaje)	
Proteínas	35 - 55	Alrededor del 80 % en forma insoluble	
Lípidos	20 - 30	Grasas	50
		Esteroides	20
		Ceras	16
		Fosfátidos	2-7
		Colina	46
		Inositol	22
		Glicerol	22
		Etanolamina	8
		Serina	0.7
Carbohidratos	Variable	Almidón, fosfatos de azúcares (3 - 7)	
Clorofila	9	Clorofila a	75
		Clorofila b	25
Carotenoides	4.5	Xantófila	75
		Caroteno	25
Ácidos nucleicos			
ARN	2 - 3		
ADN	< 0.02 - 0.1		

de almidón. En las algas verdes se ha descrito el *pirenoide*, que es una región no laminada, asociada con la síntesis de almidón, y la *mancha ocular*, que contiene gránulos de carotenoides entre los discos.²⁸

En ciertas algas, el único cloroplasto con la doble membrana externa está rodeado de otra membrana doble que depende de la envoltura nuclear. Esta relación sugiere una interacción directa entre el núcleo y el cloroplasto.²⁹

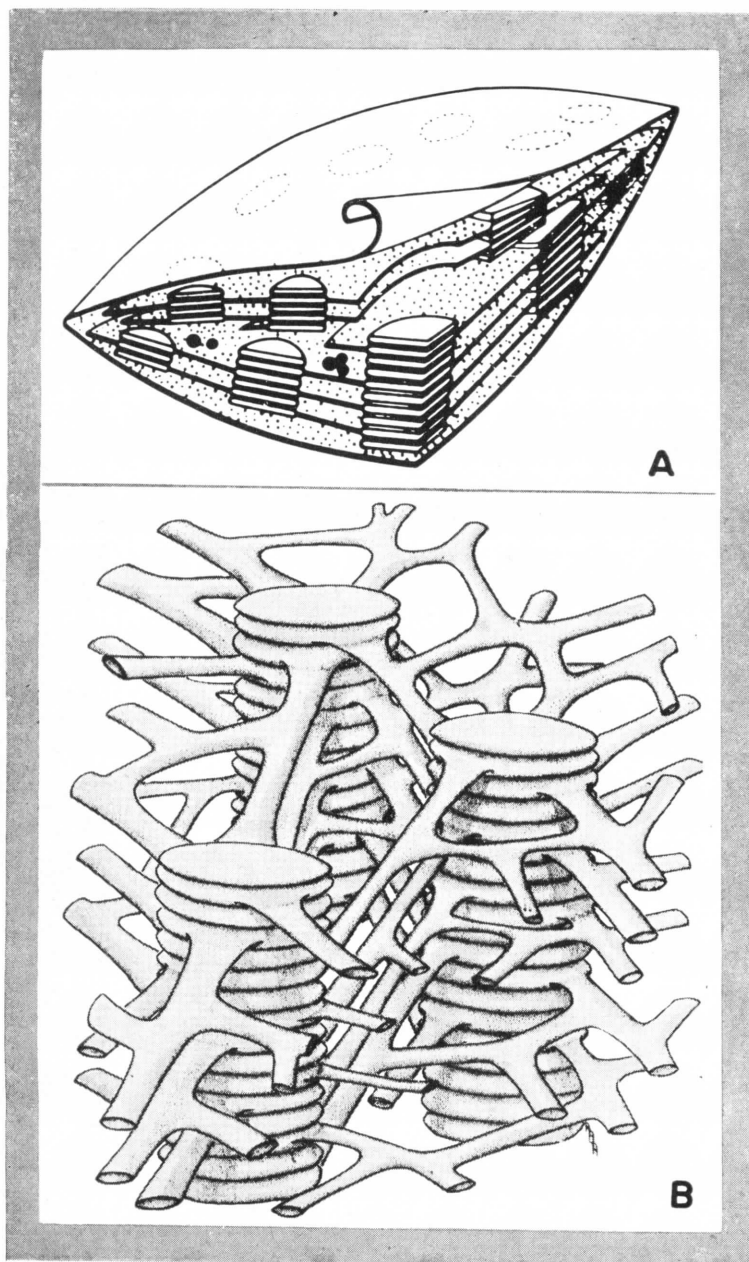


FIG. 12-9. A Esquema de cloroplastos que pone de manifiesto su estructura interna, con los grana dispuestos en filas perpendiculares a la superficie. (De G. A. Erickson, E. Kahn, B. Wallis y D. von Wettstein.) B Esquema de la ultraestructura de tres grana mostrando los túbulos anastomosantes que unen algunos de los compartimientos membranosos de los grana. (De C. E. Weir, C. R. Stocking, W. W. Thomson y H. Drever.)

La microscopía electrónica ha permitido un estudio más detallado de los cloroplastos en plantas superiores. El organoide entero se halla circunscrito por dos membranas concéntricas (como la mitocondria) que tienen la típica estructura en unidad de membrana (véase cap. 8). El cloroplasto presenta en su interior una matriz o estroma donde se encuentran los *grana* y las *membranas intergrana*.

En células de espinaca se han encontrado de 40 a 60 *grana* por cloroplasto, con un diámetro de alrededor de $0.6\ \mu$ por *grana*.

Los *grana* son estructuras cilíndricas constituidas por la superposición de sacos membranosos dobles (fig. 12-9) que, en algunos cloroplastos, están unidos por un sistema laminar *intergrana*. Mientras que antes se pensaba que las membranas *intergrana* existían en igual número que los *grana* (siendo éstos estructuras duplicadas), actualmente ha surgido otro concepto como consecuencia de diversos estudios.^{27,30} Según lo demuestra la figura 18-9, B, los *grana* están formados por compartimientos superpuestos cerrados, que se denominan *tilakoides*.³¹ El número de tilakoi-

des por *grana* puede oscilar desde unos pocos hasta 50 o más. En ciertos casos, cada gránulo se extiende como un cilindro por todo el espesor del plástido. Los *grana* adyacentes pueden comunicarse por medio de una red de túbulos flexuosos anastomosados, que unen algunos compartimientos pero no otros.

En condiciones que producen hinchamiento de los *grana in vivo* (como en plantas vuel-
tas a la luz después de una permanencia en la oscuridad o de estar sometidos a una deficiencia de Zn) o *in vitro* (como por la acción osmótica en plástidos aislados), el hinchamiento se limita a la cavidad dentro del tilakoide; hallazgo que recuerda el de los bastones retinianos (fig. 9-7). Después de la destrucción del retículo *intergrana*, los *grana* se separan como entidades individuales.

Origen de la estructura lamelar de los cloroplastos

La figura 12-10 evidencia el desarrollo de un cloroplasto durante la ontogénesis de la planta. Los proplástidos están limitados por una membrana doble. Por la acción de la luz,

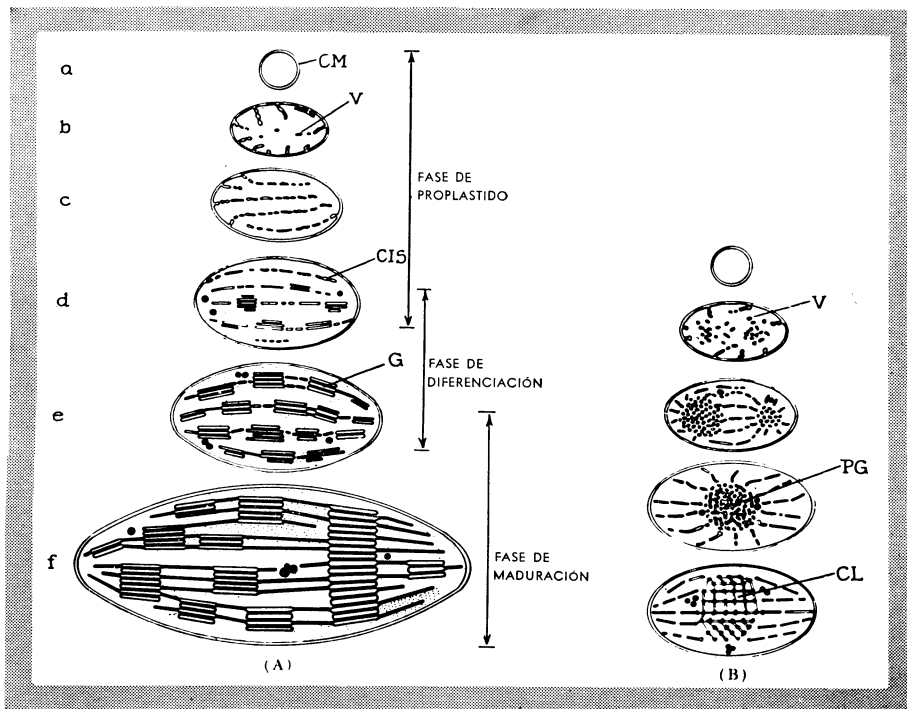


FIG. 12-10. Fases del desarrollo de un proplasto en cloroplasto bajo la presencia de la luz. B El mismo proceso, pero en la oscuridad, con la formación del *grana* primario (PG) o cuerpo prolamelar. CM, Membrana doble del cloroplasto; V, vesículas; CIS, cisternas aplanadas; CL, retículo cristalino; G, *grana*. (Modificado de D. von Wettstein.)

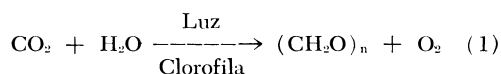
se produce un crecimiento de la membrana interna que da lugar a vesículas, las que luego se disponen formando discos grandes. En las regiones de los *grana* se constituyen pilas de sacos laminados o tilakoides. En los cloroplastos maduros, algunos compartimientos de los *grana* permanecen conectados con las membranas o túbulos de los *intergrana*, proceso cuyo desarrollo se ve muy afectado por la falta de luz. En condiciones de baja intensidad lumínica, las vesículas formadas en el proplástido se agregan formando uno o varios cuerpos prolamelares. A veces las vesículas configuran una estructura cristalina, compuesta por túbulos conectados regularmente (fig. 12-10, B).^{32, 33}

Cuando las plantas, que fueron decoloradas, son expuestas nuevamente a la luz, las vesículas se pueden fusionar en capas y desarrollarse nuevamente en *grana*. Al igual que la mitocondria, se puede considerar al cloroplasto como constituido por dos membranas que poseen diferentes funciones. La membrana interna, que contiene los sistemas fotosintético y de transporte electrónico, está formada por los *grana* y los túbulos *intergrana*, reminiscencias de las crestas mitocondriales. La membrana interna y sus estructuras relacionadas se hallan reguladas por factores genéticos nucleares y cloroplásticos (ADN intracloroplástico), así como por factores externos: luz, inhibidores metabólicos, hormonas vegetales y minerales.³⁴

Función de los cloroplastos. **Fotosíntesis**

La fotosíntesis es una de las funciones biológicas fundamentales. Por medio de la clorofila contenida en los cloroplastos, los vegetales verdes son capaces de absorber la energía, que la luz solar emite como fotones o *quanta* y trasformarla en energía química. Esta se acumula en las uniones químicas producidas por la síntesis de muchas sustancias alimenticias. En el capítulo precedente hemos visto cómo las mitocondrias son susceptibles de utilizar y trasformar la energía contenida en las sustancias alimenticias mediante la fosforilación oxidativa. En la fotosíntesis ocurre, hasta cierto punto, un proceso inverso (tabla 12-3). Los cloroplastos y las mitocondrias tienen muchas semejanzas estructurales y funcionales, pero también poseen algunas diferencias.

La principal reacción total de la fotosíntesis es:



lo cual indica que consiste en la combinación de anhídrido carbónico y agua para formar hidratos de carbono con liberación de O_2 .

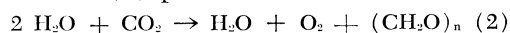
Se ha calculado que cada molécula de CO_2 de la atmósfera se incorpora al vegetal cada 200 años y que el oxígeno del aire es renovado por las plantas cada 2000 años. Sin plantas no existiría oxígeno en la atmósfera y la vida sería casi imposible.

TABLA 12-3. Diferencias entre la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa

<i>Fotosíntesis</i>	<i>Fosforilación oxidativa</i>
Sólo en presencia de luz.	Independiente de la luz.
Periódica.	Continua.
Emplea H_2O y CO_2 .	Emplea O_2 molecular.
Libera O_2 .	Libera CO_2 .
Hidroliza el agua.	Forma agua.
Reacción endergónica.	Reacción exergónica.
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{energía}$ $\rightarrow$ sustancias alimenticias.	Sustancias alimenticias $+ \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ $+ \text{energía}$.
En cloroplastos.	En mitocondrias.

Los hidratos de carbono formados al principio por la fotosíntesis son azúcares solubles que pueden acumularse como granos de almidón o de otros polisacáridos dentro del cloroplasto o, más frecuentemente, en el interior de los leucoplastos (amiloplastos). Después de varias etapas que implican la participación de diferentes tipos de plástidos y de sistemas enzimáticos, el material fotosintetizado se almacena como un producto de reserva o bien se emplea como una parte estructural del vegetal (por ejemplo, celulosa).

Desde los primeros estudios, se sugirió que en la reacción (1) el H_2O era el dador de hidrógeno del mismo modo que el SH_2 es el dador en las sulfobacterias. De esta manera la reacción (1) puede escribirse como sigue:



Esto demuestra que el agua es el dador de H_2 y que todo el O_2 liberado proviene de ella. Usando agua con oxígeno pesado (H_2^{18}O), se demostró que el origen del O_2 de la fotosíntesis proviene del agua. En este proceso, el agua actúa primariamente como dador de un protón y de un electrón.

Reacciones en la luz o fotoquímicas. Los estudios bioquímicos revelaron que la reacción (2) estaba compuesta por una serie de pasos complejos, de los cuales algunos se producen sólo en presencia de la luz y los otros pueden llevarse a cabo también en la oscuridad. Por tanto, se las denomina *reacciones en la luz y en la oscuridad*. En la primera, la luz es absorbida y empleada por la clorofila; ésta es la *reacción fotoquímica o de Hill*. En la segunda, tiene lugar la fijación y reducción del CO_2 por medio de mecanismos termoquímicos.

Robert Hill, en 1939, comprobó que las hojas molidas en agua, a la cual se le agregaron aceptores de hidrógeno (por ejemplo quinona), eran capaces de liberar O_2 cuando se las exponía a la luz, sin sintetizar hidratos de carbono.

En la actualidad, esta reacción fotoquímica se explica en términos similares a los de la fosforilación oxidativa que se produce en las mitocondrias (véase cap. 11).^{35, 36} Cuando los electrones en la clorofila son excitados por *cuanta* de luz, dan lugar a niveles más altos de energía. La energía de estos electrones se emplea para formar ATP a partir de ADP o bien para reducir algunas coenzimas (fig. 12-11). La fosforilación fotosintética puede ocurrir en cloroplastos aislados cuando se agregan factores apropiados y co-factores.

En esta reacción fotoquímica es posible considerar dos etapas: a) una de *fotofosforilación*, en la cual el ADP es transformado en ATP por medio de una cadena de transportadores (*carriers*), y b) una de *ionización e hidrólisis del agua*, que produce la reducción del TPN a TPNH_2 .

En contraste con la fosforilación oxidativa de las mitocondrias, el O_2 no se emplea en la fotofosforilación (tabla 12-3). Los vegetales verdes por medio

de este proceso pueden producir 30 veces más ATP que mediante la fosforilación oxidativa de sus propias mitocondrias. Además, en ellos existe mucho mayor proporción de cloroplastos que de mitocondrias. No se identificaron todavía completamente los transportadores de electrones empleados en la fotofosforilación. Corresponden a moléculas que contienen vitamina K, TPN y riboflavina (FMN), así como citocromos especiales aún no determinados en células animales.

También existen las denominadas *ferredoxinas*, que al igual que los citocromos realizan oxidorreducción electrónica simple, y vitamina K_1 , o *filoquinona*, que actúa en el sistema de transporte electrónico durante la fotosíntesis. Otro compuesto similar es la *plastoquinona*. Conviene destacar que estas quinonas guardan relación con la coenzima Q, presente en la cadena respiratoria mitocondrial.

En la figura 12-11 se esquematizan los tres caminos principales que puede seguir la reacción fotoquímica y cómo se acopla a las reacciones en la oscuridad (asimilación del CO_2) para sintetizar hidratos de carbono (almidón).

Las reacciones en la oscuridad o termoquímicas de la fotosíntesis. En el esquema de la figura 12-11 se observa que junto con la energía provista por el ATP, el TPNH reducido puede llevar a cabo la reducción del CO_2 atmosférico y combinarlo con el hidrógeno para sintetizar los diferentes carbohidratos. Este proceso comprende muchos pasos y enzimas que fueron dilucidados principalmente por el empleo de CO_2 radiactivo en una serie de brillantes experimentos.³⁷ Las reacciones correspondientes (fig. 12-12) son tan rápidas que, después de la adición de CO_2 , aparecen al cabo de un segundo o menos. Las reacciones se producen en completa oscuridad sólo si el vegetal

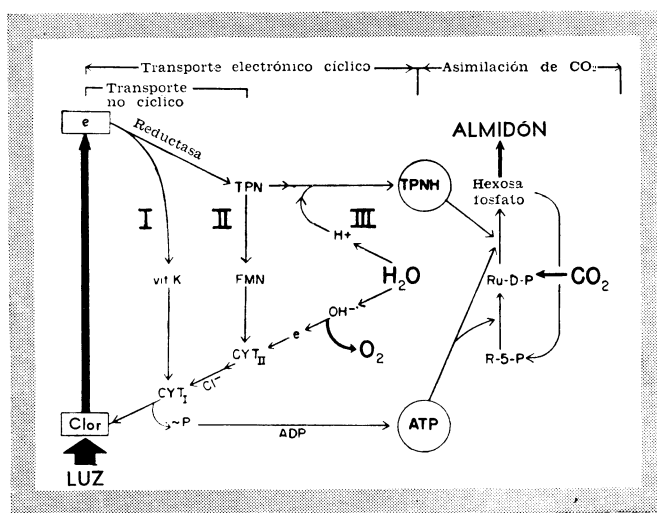


FIG. 12-11. Esquema de las reacciones fotoquímicas durante la fotosíntesis (de acuerdo con D. I. Arnon). La clorofila (Clor) al absorber un quantum de luz se excita y los electrones (e^-) alcanzan mayores niveles de energía. Esta energía es empleada para reducir diferentes coenzimas y para producir uniones de alta energía de ATP. En el camino cíclico I y II, la reducción se realiza por medio de la vitamina K y por el fosfato de riboflavina (FMN). En el camino no cíclico III, el transporte de electrones se efectúa mediante el trifosfopiridinnucleótico (TPN). El TPNH y el ATP formados se emplean en la reacción de la fotosíntesis en la oscuridad para asimilar el CO_2 , en la síntesis de los hidratos de carbono. (Véase fig. 12-12.)

ciones paracristalinas de partículas de 200×100 Å (fig. 12-13), a los cuales se denominó *quantasomas*.⁴¹ Los agregados de 500×100 Å, constituidos por tres a seis de estas partículas, son capaces de producir la reacción de Hill y, en presencia de CO_2 y de la frac-

ción sobrenadante, de fijar el CO_2 .⁴² Más recientemente se comprobó que el quantasoma está compuesto por cuatro subunidades.⁴³ La ultraestructura del cloroplasto fue estudiada, con posterioridad, por medio de la denominada técnica de *congelación-grabado*, que



FIG. 12-13. Fotomicrografía electrónica, obtenida por el método de congelación-grabado, de la superficie de fractura de las laminillas cloroplásticas. Se observan tres tipos de superficies: en la zona 1-2 se ven partículas que corresponden al tamaño de los quantosomas; en la zona 5-6 se observan partículas menores (110 Å) y más apretadas; en la zona 3-4, la superficie de la membrana carece en general de partículas. 90,000 $\times$. (Cortesía de R. B. Park.)

consiste en el congelamiento de los cloroplastos intactos en nitrógeno líquido, sometiéndolos luego a una fractura y sombreando la superficie de la membrana con platino.⁴⁴ Por medio de esta técnica es posible distinguir tres tipos distintos de estructuras. El primero corresponde a la partícula del quantasoma; el segundo está compuesto por partículas más pequeñas (110 Å) y agrupadas más cerca unas de las otras; finalmente, el tercer tipo corresponde a la superficie de la membrana, que presenta una textura rugosa y pocas o ninguna partícula⁴⁵ (fig. 12-13). De acuerdo con este punto de vista, tanto el quantasoma como las partículas pequeñas se encuentran dentro de las membranas de los tilakoides.

El concepto de quantasoma como unidad fotosintética ha sido sujeto recientemente a controversia.^{46,47} En cloroplastos tratados con EDTA (etileno-diamino-tetracetato), que fija los iones Ca^{++} y otros iones bivalentes, se encontró que las membranas carecían de partículas. Dichas membranas experimentaron un desacoplamiento de la fotofosforilación al serles extraída una ATPasa dependiente de Ca^{++} . No obstante, con la ayuda de la técnica de congelación-grabado se demostró que las membranas aún contenían los dos tipos de partículas presentes en los cloroplastos normales.⁴⁸ Parecería, entonces, que el EDTA extrae el factor de acoplamiento, mientras que el quantasoma permanece intacto.⁴⁹

En términos físicos, podría postularse que las reacciones oscuras, por ser de naturaleza termoquímica, no necesitan de un orden estructural preciso y son realizadas por enzimas solubles. Por el contrario, la fotofosforilación implica la separación de cargas negativas y positivas. Los electrones excitados de la clorofila tendrían que fluir hacia la ferredoxina, la plastoquinona y los citocromos para poder llevar a cabo la fotofosforilación.

Los cloroplastos como organoides semiautónomos

Los cloroplastos, lo mismo que las mitocondrias (véase cap. 11), pueden evidenciar determinado grado de autonomía funcional dentro de la célula. De hecho, en las divisiones que aquéllas experimentan podría encontrarse cierto grado de información genética (herencia citoplásmica).

Los cloroplastos contienen su propio ADN, que es distinto del ADN nuclear; poseen asimismo ribosomas especiales, más pequeños que

los que se encuentran en el citoplasma, y toda la maquinaria necesaria para activar la síntesis proteica.

División de los cloroplastos. Desde el trabajo de Schimper y Meyer (1883) se acepta que los plástidos pueden multiplicarse por fisión. Ello se observa fácilmente en algunas especies unicelulares de algas que contienen un solo cloroplasto (fig. 12-8). En *Nitella* ha podido registrarse microcinematográficamente un ciclo divisional de 18 horas de duración.⁵⁰

El proceso de reproducción de los plástidos por medio de la fisión es tan ordenado como el que se aprecia en los cromosomas e implica un proceso de crecimiento de los plástidos hijos. Ya hemos mencionado de que manera los plástidos se diferencian durante el desarrollo y como se altera su ultraestructura por acción de diferentes factores externos (por ejemplo, la luz).

Herencia citoplásmica. Hay diversos ejemplos en que la transmisión de los caracteres no sigue la típica segregación mendeliana, indicando un tipo de herencia extracromosómica. Este hecho ya fue demostrado experimentalmente. Cuando el alga verde unicelular *Euglena* es cultivada en la oscuridad, contiene proplástidos incoloros y pequeños. Si en estas condiciones el núcleo es irradiado con un microhaz ultravioleta, los proplástidos son todavía capaces de transformarse en cloroplastos.⁵¹ Sin embargo, cuando el citoplasma es irradiado (bloqueando el núcleo), se desarrolla un número considerable de colonias incoloras, carentes de cloroplastos. Los resultados precedentes sugieren que existe un ADN citoplásmico en este tipo de algas.

Acido desoxirribonucleico en los cloroplastos. En la actualidad, se admite generalmente que existe un ADN característico en cloroplastos de algas y vegetales superiores. En cloroplastos de *Chlamydomonas* se halló un material Feulgen positivo, observándose con el microscopio electrónico delgados filamentos de ADN.⁵² Estos hechos fueron confirmados en diversas especies de algas y en plantas superiores. La microscopía electrónica permitió reconocer, también, regiones de ADN semejantes a nucleoides bacterianos.^{53,55} La cantidad de ADN por cloroplasto sería ligeramente distinta según la especie, pero se encuentra alrededor de los 2.5×10^{15} g, valor ligeramente inferior al registrado en *Escherichia*

coli. De los cloroplastos se aislaron segmentos de ADN de aproximadamente 150 μ de longitud.

Ribosomas en los cloroplastos. Como se mencionará más adelante (véase cap. 18), los ribosomas se separan en dos tipos principales: los ribosomas de 70S, de las bacterias, y los ribosomas de 80S, de las células de eucariotes, sea de plantas o de animales. Mediante microscopía electrónica puede demostrarse fácilmente la presencia de partículas tipo ribosoma dentro de los cloroplastos. Ribosomas de menor tamaño que los citoplásmicos y también polisomas han sido aislados de cloroplastos.^{57, 58} En éstos, por medio de investigaciones más recientes se identificaron ribosomas que contenían ARN de 23S y 16S y se observó la existencia de una hendidura dividiendo a las dos unidades ribosómicas.⁶¹

Síntesis de proteínas. El descubrimiento de que los cloroplastos poseen un tipo especial de ribosomas, suministró la evidencia de que en ellos se encuentra un sistema específico para la síntesis proteica.⁶² En presencia de CO₂, como única fuente de carbono, los cloroplastos incorporan activamente aminoácidos a las proteínas. Estos organoides contienen ARN mensajero en cantidad suficiente como para desarrollar la máxima actividad del sistema de síntesis proteica. Dicho sistema es inhibido preferentemente por el cloranfenicol en concentraciones que no afectan la síntesis proteica citoplásmica.⁶³

De la información mencionada se deduce que los cloroplastos contienen bastante ADN como para codificar gran número de proteínas y que cuentan con todos los mecanismos destinados a realizar una síntesis proteica dirigida por ADN-ARN. Sin embargo, constituye todavía una incógnita la manera en que las proteínas son codificadas por el sistema ADN-ARN del cloroplasto. Existen algunas evidencias genéticas que indican la posible subordinación de varias enzimas fotosintéticas al control nuclear. Recientemente, como resultado del empleo de cloranfenicol para inhibir la síntesis proteica ribosómica del cloroplasto y de cicloheximida para inhibir la síntesis proteica ribosómica citoplásmica, se sugirió que ambos procesos contribuyen a la síntesis de proteínas de la membrana cloroplástica.⁶⁴

Origen simbiótico de los cloroplastos. La lectura de los párrafos precedentes sugiere

que los cloroplastos podrían tener muchas características de organismos semiautónomos, es decir, de organismos vivientes dentro de las células vegetales. Los cloroplastos se dividen, crecen y se diferencian, contienen ADN, ARN ribosómico, ARN mensajero y son capaces de llevar a cabo la síntesis proteica. Conforme a ciertas hipótesis, los cloroplastos serían el resultado de una simbiosis entre un microorganismo autotrófico, susceptible de capturar la energía lumínica y una célula huésped heterotrófica (véase capítulo 11). Aunque esta conjetura no carece de interés, es evidente que el sistema de transporte de electrones de los cloroplastos y las enzimas requeridas para la síntesis de los pigmentos fotosintéticos son controlados por los genes que se encuentran en el núcleo.⁶⁵

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Arnon, D. I.: (1967) Photosynthetic activity of Isolated chloroplasts. *Physiol. Rev.*, 47(3), 317.
- Buvat, R.: (1959) Recherches sur les infrastructures du cytoplasme dans le cellulose du méristème apical des ébauches foliaires et des feuilles développées de *L'Elodea canadensis*. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, II série, 121.
- Dauwalder, M., Whaley, W. G. and Kephart, J.: (1969) Phosphatases and differentiation of the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.*, 4:455.
- Erickson, R. O.: (1959) Patterns of cell growth and differentiation in plants. In: *The cell*, vol. 1, p. 497. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Granick, S.: (1961) The chloroplasts: Inheritance, structure and function. In: *The cell*, vol. 2, p. 489. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Hoover, J. K., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1969) Formation of chloroplast membranes in *Chlamydomonas reinhardtii* *y-1*. *J. biol. Chem.*, 244:2621.
- Mühlethaler, K.: (1961) Plant cell walls. In: *The cell*, vol. 2, p. 85. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Rabinowitch, E.: (1945) *Photosynthesis*. Interscience Publishers, New York.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Mühlethaler, K.: (1961) Plant cell walls. In: *The cell*, vol. 2, p. 85. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
2. Erickson, R. O.: (1959) Patterns of cell growth and differentiation in plants. In: *The cell*, vol. 1, p. 497. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
3. Porter, K. R. and Machado, R. D.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:167.
4. Frey-Wyssling, A., López-Sáez, J. F. and Mühlethaler, K.: (1964) *J. Ultrastruc. Res.*, 10:422.
5. Hepler, P. K. and Newcomb, E. H.: (1967) *J. Ultrastruc. Res.*, 19:498.

6. Porter, K. R.: (1957) *Harvey Lect.*, ser. 51 (1955-1956), p. 175.
7. Buvat, R. and Carasso, N.: (1957) *C. R. Acad. Sci.*, 244:1532.
8. Porter, K. R.: (1966) In: *Principles of biomolecular organization*, p. 308. Ciba Found. Symp. Wolstenholme, G. E. W., ed. (1966). J. A. Churchill Ltd., London.
9. Hepler, P. K. and Newcomb, E. H.: (1964) *J. Cell Biol.*, 20:529.
10. Cronshaw, J. and Bouck, G. B.: (1965) *J. Cell Biol.*, 24:415.
11. Bonnet, H. T. and Newcomb, E. H.: (1965) *J. Cell Biol.*, 27:423.
12. Buvat, R.: (1959) *Ann. Sc. Nat. Bot.*, II^e série, 121.
13. Guillermond, A., Mangenot, G. and Plantefol, L.: (1933) *Traité de Cytologie végétale*. Le François, Paris.
14. Guillermond, A.: (1934) *Rev. Cytol. Cytophysiol. végét.*, 1:197.
15. Whaley, W. G. and Mollenhauer, H. H.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:216.
16. Mollenhauer, H. H. and Whaley, W. G.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:222.
17. Northcote, D. H. and Pickett-Heaps, J. D.: (1966) *Biochem. J.*, 98:159.
18. Guillermond, A.: (1922) *C. R. Acad. Sci.*, 175: 283.
19. Newcomb, E. H.: (1967) *J. Cell Biol.*, 33:143.
20. Granick, S.: (1961) The chloroplasts: Inheritance, structure and function. In: *The cell*, vol. 2, p. 489. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
21. Itoh, M., Izawa, S. and Shibata, K.: (1963) *Biochim. biophys. Acta*, 66:319.
22. Packer, L.: (1966) In: *Biochemistry of chloroplasts*. Goodwin, T. W., ed. 1, p. 233. Academic Press, New York.
23. Ohnishi, T. J.: *Biochem.*, 55:494.
24. Criddle, R. S. and Park, L.: (1964) *B. B. R. Coman*, 17:74.
25. Ris, H. and Plaut, W.: (1962) *J. Cell Biol.*, 13:383.
26. Rhoades, M. M.: (1955) *Encyclopedia Plant Phys.*, 1:19.
27. Weier, T. E., Stocking, C. R., Thompson, W. W. and Drever, H.: (1963) *J. Ultrastruct. Res.*, 8:122.
28. Sager, R. and Palade, G. E.: (1957) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 3:463.
29. Gibbs, S. P.: (1962) *J. Cell Biol.*, 14:433.
30. Gibbs, S. P.: (1960) *J. Ultrastruct. Res.*, 4:127.
31. Menke, W.: (1962) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13:27.
32. Wilsenach, R.: (1963) *J. Cell Biol.*, 18:419.
33. von Wettstein, D.: (1959) *J. Ultrastruct. Res.*, 3:235.
34. Park, R. B.: (1967) In: *Organizational Biosynthesis*. H. J. Vogel et al. (eds.) Academic Press, New York.
35. Arnon, D. I.: (1959) *Nature*, 184:10.
36. Arnon, D. I.: (1960) *Scient. Amer.*, 203:104.
37. Calvin, M.: (1962) *Science*, 135:879.
38. Arnon, D. I., Allen, M. B., Whatley, F. R., Campdale, J. B. and Rosenberg, L. L.: (1956) *Proc. Intern. Congr. Biochem. 3rd Congress, Brussels*, 1955, p. 277.
39. Trebst, A. V., Tsujimoto, H. Y. and Arnon, D. I.: (1958) *Nature*, 182:351.
40. Park, R. B. and Pon, N. G.: (1961) *J. molec. Biol.*, 3:10.
41. Park, R. B. and Pon, N. G.: (1963) *J. molec. Biol.*, 6:105.
42. Sauer, K. and Calvin, M.: (1962) *J. Molec. Biol.*, 4:451.
43. Park, R. B. and Beggins, J.: (1964) *Science*, 144:1009, 201A.
44. Mühlethaler, K., Moor, H. and Szarkowski, J. W.: (1965) *Planta*, 67:305.
45. Branton, D. and Park, R. B.: (1967) *J. Ultrastruct. Res.*, 19:283.
46. Howell, S. H. and Moundrianakis, E. M.: (1967) *J. molec. Biol.*, 27:323.
47. Howell, S. H. and Moundrianakis, E. M.: (1967) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1261.
48. Park, R. B. and Pfeiffer, A. O. A.: (1968) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 60:337.
49. Dilley, R. A., Arntzen, Ch. J. and Vernon, L. P.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:34a.
50. Green, P.: (1964) *Amer. J. Botany*, 51:334.
51. Gibor, A. and Granick, S.: (1962) *J. Cell Biol.*, 15:599.
52. Ris, H. and Plaut, W.: (1962) *J. Cell Biol.*, 13:383.
53. Gunning, B. E. S.: (1965) *J. Cell Biol.*, 24:79.
54. Kiselev, N., Swift, H. and Bogorad, H.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25:327.
55. Bisalputra, T. and Bisalputra, A. A.: (1967) *J. Ultrastruct. Res.*, 17:14.
56. Woodcock, C. L. F. and Fernández-Morán, H.: (1968) *J. molec. Biol.*, 31:627.
57. Lyttleton, J. W.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 26:312.
58. Clark, M. F., Matthews, R. E. F. and Ralph, R. K.: (1964) *Biochim. biophys. Acta*, 91:289.
59. Stutz, E. and Noll, H.: (1967) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 57:774.
60. Bager, R. and Hamilton, M. G.: (1967) *Science*, 157:709.
61. Bruskov, V. I. and Odintsova, M. S.: (1968) *J. molec. Biol.*, 32:471.
62. Brawerman, G. and Eisenstadt, J. M.: (1967) In: *Organizational Biosynthesis*, p. 419. (H. J. Vogel et al., eds.) Academic Press, New York.
63. Pogo, B. G. T. and Pogo, O.: (1965) *J. Protozool.*, 12:96.
64. Hooper, J. K. and Siekevitz, P.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:62a.
65. Kirk, J. T. O.: (1966) In: *Biochemistry of chloroplasts*, p. 319. (T. W. Goodwin, ed.)

SEXTA PARTE

BASES CELULARES DE LA CITOGENETICA

En los tres capítulos que siguen se estudiará al núcleo y a los cromosomas como entidades vinculadas con la actividad genética en un nivel celular; es lo que suele denominarse también bases cromosómicas de la genética. Esta investigación, comenzada a fines del siglo pasado, adquirió un desarrollo tal que durante muchos años fue el aspecto mejor conocido de la Citología. El progreso de la *cariología* (del griego: *carion*, núcleo) se hizo en detrimento del estudio de la célula considerada como un todo y de los aspectos moleculares y químicos ahora comprendidos dentro del campo de la Biología celular.

Este análisis se inicia con el ciclo vital por el que atraviesan las diferentes células, desde aquellas que se dividen continuamente hasta las que permanecen en una larga interfase durante toda la vida (por ejemplo, células nerviosas). El ciclo vital está relacionado directamente con los procesos de división mitótica y meiótica, y con el concepto de la continuidad de los cromosomas como entidades susceptibles de autoduplicarse y de mantener su morfología y función a lo largo de divisiones sucesivas.

En citogenética, tiene suma importancia el conocimiento de las constantes morfológicas del cromosoma, como su número, forma, tamaño, presencia de constricciones primarias y secundarias, etcétera, que en conjunto constituyen el cariotipo. Parte de este estudio se realizó en el capítulo 3. La interpretación de las divisiones mitótica y meiótica únicamente puede obtenerse desde su base conociendo los ciclos del cromonema, o filamento del cromosoma, y del centríolo; este último es un componente citoplásmico que en la mayoría de las células animales se identifica estrechamente con la formación del aparato mitótico.

Sólo es posible comprender a la citogenética propiamente dicha si se juzga la meiosis como una división que conduce a la reducción cromosómica y a la recombinación e intercambio de bloques de genes mediante el *crossing-over*, el cual se manifiesta citológicamente por los quiasmas.

En el capítulo de citogenética se expondrán de manera sucinta las bases cromosómicas de las leyes o principios de Mendel y de los “ligamientos” entre genes diversos, los cuales dependen de la posición de éstos en el cromosoma y de la presencia o ausencia de *crossing-over*. Respecto de dichas consideraciones, se mencionarán los principios que permiten construir mapas genéticos en los cromosomas.

Una parte importante del capítulo 14 está destinada al estudio de la mutación como concepto genético y de las diversas aberraciones cromosómicas que pueden producirse espontáneamente o mediante el uso de radiaciones y agentes químicos. También en forma muy breve se considerarán los aspectos cromosómicos de la evolución.

Debido a que el estudio del cariotipo humano, normal y patológico, ha adquirido en los últimos años una importancia citogenética trascendental, se incluyó este material en un capítulo aparte, junto con la determinación cromosómica del sexo. Esas investigaciones tienen considerable interés teórico y aplicado, por su derivación en las enfermedades hereditarias y por los trastornos sexuales y de diversa naturaleza que pueden suscitarse como consecuencia de aberraciones cromosómicas en el ser humano. Este tema será de gran utilidad para el estudiante de medicina, puesto que su lectura le permitirá interpretar el mecanismo patogénico de muchas enfermedades hereditarias y malformaciones congénitas.

División celular: mitosis y meiosis

El *crecimiento* y desarrollo de los organismos vivos dependen del crecimiento y multiplicación de sus células. En los organismos unicelulares, la división celular implica una verdadera reproducción y por este proceso, a partir de la célula primitiva, se originan dos o más individuos. Por el contrario, los organismos multicelulares provienen de una sola célula, el *cigoto*, y la repetida multiplicación de ella y de sus descendientes, determina el desarrollo y crecimiento del individuo.

El tamaño de la mayoría de los organismos está determinado por el número de elementos celulares que los componen y no por el volumen de las células individuales. Cada clase de célula tiene una uniformidad general de volumen, que puede diferir acentuadamente en células de distinto tipo. En muchos casos, la célula parece crecer hasta cierto límite, antes que se produzca una división. Este proceso se repite nuevamente en las dos células hijas, de modo que el volumen total será en definitiva de cuatro veces el de la célula original. El crecimiento de la célula viviente se produce rítmicamente y de acuerdo con una progresión geométrica, expresable en la siguiente forma:

$$\frac{Mn}{Mc}, \frac{2 Mn}{2 Mc}, \frac{4 Mn}{4 Mn}, \frac{8 Mn}{8 Mn}, \text{ etcétera}$$

donde *Mn* representa la masa nuclear y *Mc* la masa citoplásmica de la célula. Entre las dos masas existe un equilibrio óptimo, la denominada *relación* o *índice nucleoplasmático*.

Este equilibrio no sólo implica una relación de volúmenes sino también una relación química. Hemos visto que en los cromosomas politénicos, por un proceso de endomitosis, el ácido desoxirribonucleico (ADN) puede aumentar hasta mil veces (véase cap. 3); por

consiguiente, el volumen del citoplasma crece considerablemente. En la figura 13-1 se compara a una célula somática común con una célula gigante del mismo animal. Es dable advertir que el núcleo de la célula somática corresponde a una pequeña porción de un cromosoma politénico.

La *división celular* constituye un fenómeno muy complejo, por medio del cual el material celular se divide en partes iguales entre las células hijas. Este proceso es sólo la fase final y microscópicamente visible de un cambio subyacente que ha ocurrido en los niveles bioquímicos y macromolecular. Antes que la célula se divida por mitosis, tiene lugar la duplicación y división de todos los componentes fundamentales, en especial de los relacionados con la transmisión hereditaria. Al respecto, la mitosis o división celular puede ser considerada como la separación final de las unidades macromoleculares previamente duplicadas (véase cap. 17).

En este capítulo haremos un análisis citológico detallado de la mitosis y meiosis, cuyos mecanismos esenciales fueron considerados en el capítulo 3.

MITOSIS

En el proceso de división, cada célula se caracteriza por la presencia de dos componentes fundamentales que constituyen la figura mitótica: el aparato cromático y el aparato acromático. El aparato cromático incluye los cromosomas, aun cuando los nucléolos también pueden ser considerados como integrantes, ya que participan en el ciclo mitótico. El aparato acromático está formado por: 1) los centros o polos, y 2) el huso.

Análisis de la mitosis

La figura 13-2 representa un esquema general de las diferentes etapas de la mitosis. Dichas etapas son fases de un ciclo que se inicia con el final del período intermitótico o *interfásico* y termina con el comienzo de la nueva interfase. Las principales divisiones de ese ciclo son: *profase*, *prometáfase*, *metáfase*, *anafase* y *telofase*.

En la *profase*, la célula tiende a adoptar una forma esférica y aumentan su refringencia y viscosidad. Los cromosomas aparecen como delicados filamentos arrollados longitudinalmente, extendidos u ovillados dentro de la esfera nuclear (fig. 13-2, 1, 3).

Cada cromosoma profásico está compuesto por dos filamentos espirales, denominados *cromátidas*, que se hallan en relación íntima en toda su longitud. A medida que la profase progresa, las dos cromátidas se acortan y aumentan de espesor. Observando cuidadosamente, puede verse al centrómero como una zona pequeña y clara, cuya posición es constante para cada cromosoma. Esta región parece desempeñar un papel fundamental en el movimiento de los cromosomas y mantiene una relación dinámica con los centros celu-

lares o polos. Con el aumento en espesor de los cromosomas, la región del centrómero se halla más acentuada y en la *metáfase* aparece como una constricción, la *constricción céntrica* o *primaria*.

Durante la *profase* temprana, los cromosomas se distribuyen al azar en la cavidad nuclear. A medida que transcurre la profase, los cromosomas tienden a acercarse al borde de la membrana nuclear, dejando vacía la cavidad central del núcleo. El movimiento centrífugo de los cromosomas indica que se aproxima la desintegración de la membrana nuclear y con ella el fin de la profase. En este momento, cada cromosoma aparece constituido por dos elementos cilíndricos longitudinales y paralelos. El acortamiento de los cromosomas ha llegado casi al máximo y algunos de ellos pueden haberse contraído hasta 25 veces con respecto a la longitud original en la profase temprana.

La formación del huso experimenta diversas variaciones. En el tipo conocido como *huso central*, éste comienza en la vecindad de los centriolos, que se encuentran a un lado de la membrana nuclear. Cada centriolo, que en realidad es doble, presenta un áster, con los rayos astrales, y formándose entre los dos ásteres, existe un haz de delicados filamentos, el *huso*. Los centriolos continúan desplazándose junto con los ásteres, en un camino semicircular hacia los polos, hasta que quedan situados en posiciones opuestas (figura 13-2, 1 a 4).

Existe otro tipo de formación del huso, el denominado *huso metafásico*, en el cual los centriolos se hallan polarizados antes que comience la división y que el huso se forme en la *metáfase*. La mitosis que tiene centriolos y ásteres recibe el nombre de *astral* o *anfiastral* y se observa por lo común en las células animales y en algunos vegetales inferiores. Las mitosis que carecen de estos centros se designan *anastrales* y son características de la gran mayoría de los vegetales y de ciertos invertebrados (insectos hemípteros).

La *prometáfase* comienza generalmente con la desintegración de la membrana nuclear. En el centro de la célula se distingue una zona más fluida en la que los cromosomas se mueven con mayor libertad y realizan su camino en aparente desorden hacia el ecuador (fig. 13-2, 4).

La *metáfase* se inicia cuando los cromosomas alcanzan el plano del ecuador, donde se disponen radialmente en la periferia del

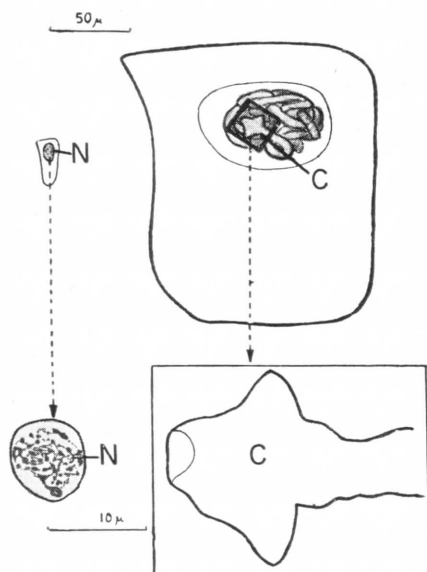


FIG. 13-1. Esquema que indica la relación del volumen celular y del nuclear con la politenia. A la izquierda. Una célula somática diploide de tamaño normal. A la derecha. Una célula similar, pero de la glándula salival de la larva. Abajo se ve que el núcleo de la célula diploide cabe dentro de un segmento de un cromosoma gigante politénico. (Cortesía de C. Pavan.)

huso como si se rechazaran los unos a los otros (fig. 13-2, 5). En las células vegetales, los cromosomas se distribuyen irregularmente y ocupan toda la superficie del plano ecuatorial del huso.

Cuando existen pequeños cromosomas en

el conjunto, éstos se disponen por lo general hacia el interior y los más grandes aparecen comúnmente en la periferia.

La disposición de los cromosomas en el huso recibe el nombre de *placa ecuatorial*. En la metafase, los cromosomas están vincu-

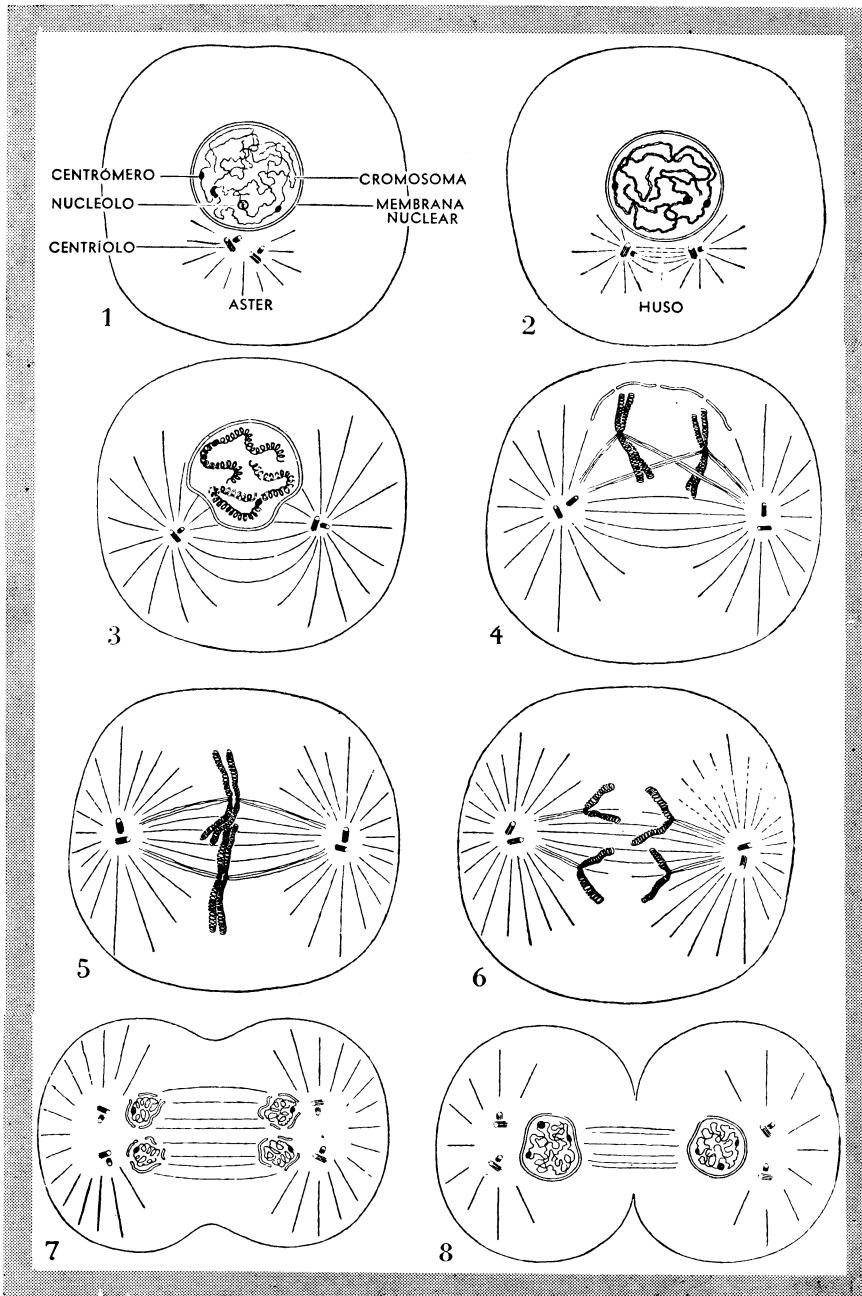


FIG. 13-2. Esquema del proceso mitótico de una célula ideal que contiene dos cromosomas. Se insiste sobre el ciclo de los cromosomas y de los centriolos. 1 a 3 Profase. 4 Prometáfase. 5 Metáfase. 6 Anafase. 7 y 8 Telofase. (De D. Mazia.)

lados con las fibras del huso por medio de los centrómeros. Las fibras del huso que se conectan con los cromosomas toman el nombre de *fibras cromosómicas* y las que se extienden sin interrupción de un polo al otro, de *fibras continuas*. Cuando los cromosomas se observan en vista polar, puede determinarse con relativa facilidad su número, forma y dimensiones.

El equilibrio de fuerzas que caracteriza al estadio metafásico se altera por la división del centrómero, que ha unido hasta ese momento a las cromátidas. Esta división tiene lugar simultáneamente en todos los cromosomas. Los centrómeros hijos y las cromátidas

se separan, comenzando su traslado hacia los polos (fig. 13-2, 6). Dicho proceso caracteriza el comienzo de la *anafase*. A partir de este período las cromátidas, ahora denominadas *cromosomas hijos*, se acortan longitudinalmente y empiezan a separarse. Durante la mitad final de la anafase ocurre un cambio en el aspecto del huso. En la zona situada entre los dos grupos de cromosomas, las fibras del huso parecen extenderse y constituyen las *fibras interzonales*.

El final de la emigración polar de los dos grupos de cromosomas hijos indica el comienzo de la *telofase*. En ese estadio, en preparaciones favorables, se puede evidenciar la es-

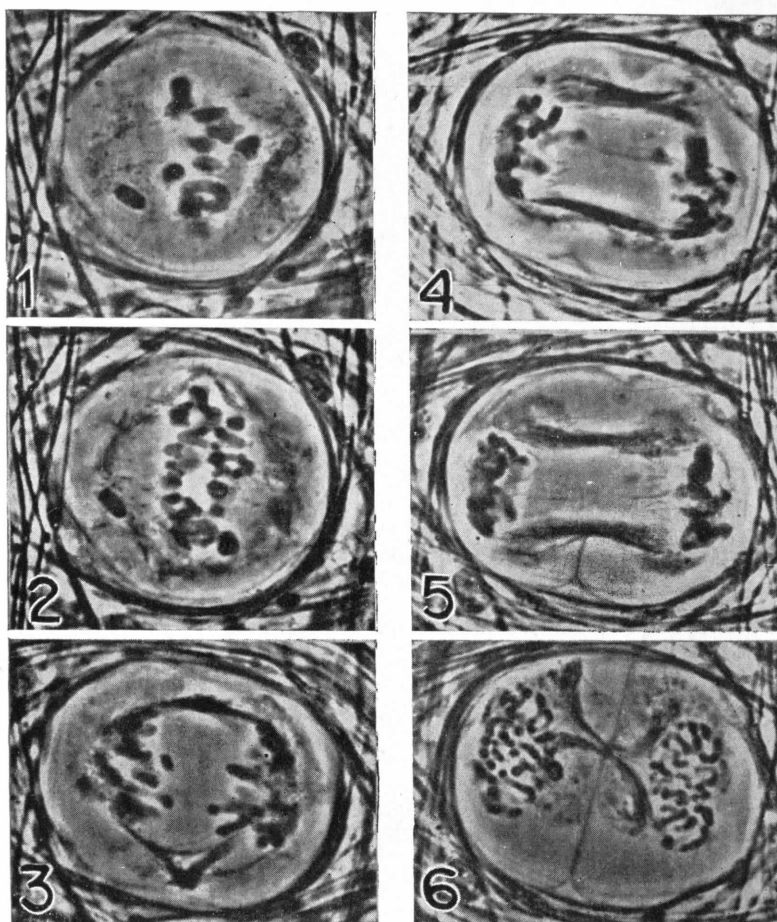


FIG. 13-3. División del espermatocito de la langosta, observada en contraste de fase en un medio de plasma de bovino al 12,3 por ciento, que permite el examen de las células sin aplastarlas. 1 Prometafase final con el cromosoma sexual a la izquierda; las mitocondrias aparecen como filamentos cortos y como gránulos. 2 Metafase final: las mitocondrias comienzan a orientarse. 3 Anafase: las mitocondrias se concentran en el ecuador. 4 y 5 Telifase: todas las mitocondrias se hallan a los lados del huso. 5 Se ve el comienzo de la estrangulación que empuja a las mitocondrias. 6 Final de la telifase: las mitocondrias forman un manójo que se expande en ambas células hijas. (Cortesía de R. Barer y S. Joseph, 1957.)

estructura espiral de los cromosomas con sus cromonemas. Poco después tiene lugar el proceso de reconstrucción nuclear, que se parece a un proceso profásico invertido. Los cromosomas pierden su estado de condensación, las espirales de los cromonemas se desenrollan y se produce la inhibición del nucleoplasma circundante, mientras se reconstruye la membrana nuclear de los núcleos hijos (fig. 13-2, 7 y 8). En los estadios finales reaparecen los nucléolos en los organizadores nucleares o *zonas SAT*.

Simultáneamente se produce la *citocinesis*, es decir, la segmentación y separación del citoplasma. En las células animales el citoplasma se constriñe en la región ecuatorial, constricción que se acentúa y profundiza durante la división celular (fig. 13-2, 8). El proceso puede seguirse en las células vivientes con el microscopio de fase (fig. 13-3).

En células de animales superiores, el período de citocinesis se caracteriza por un movimiento activo de la superficie celular, que recibe el nombre de "burbujeo". Este movimiento típico se puede inducir en células en cultivo que no se dividen por medio de la adición de sustancias susceptibles de unirse a cationes bivalentes (como el Ca^{++}). Algunos autores sugieren que el burbujeo reflejaría la actividad de la rápida expansión de la membrana.¹ En las células ameboides, durante la telofase, ambas células hijas poseen movimientos activos que las separan por tracción. Esto se observa mejor en filmaciones de células en división.

En el curso de la telofase ocurren otros cambios citoplásmicos. La alta viscosidad, característica de la metafase y la anafase, disminuye, la actividad de los centriolos cesa y los ásteres se hacen menos visibles. Durante la citocinesis tiene lugar la distribución de los componentes citoplásmicos, incluyendo las *mitocondrias* y el complejo de Golgi.

En la tabla 13-1 se indica la duración de las diferentes fases de la mitosis en varios tipos celulares.

El centro celular en la mitosis

El centro celular es un organoide citoplásmico que se ha encontrado hasta ahora en las células animales y en algunos vegetales inferiores. Desde los clásicos trabajos de Van Beneden, Boveri, Heidenhain, Wilson y otros, se demostró que dicho componente celular contiene un pequeño gránulo simple o doble (diplosoma), denominado centriolo. Mientras que éste es su aspecto en la interfase, en la mitosis alcanza mayor grado de complejidad y forma parte de una estructura grande y complicada, el *aparato mitótico*.

En la mayoría de las células el centriolo no puede examinarse *in vivo*, a pesar de lo cual fue observado durante la mitosis de fibroblastos.² En preparaciones fijadas y coloreadas de células en mitosis, el centriolo está frecuentemente rodeado de una zona clara —el *microcentro* o *centrosoma*— y luego de una zona más densa, la *centrosfera*, de la cual irradia el *áster* o *astrosfera* (fig. 13-4). Durante la profase mitótica, a medida que los centriolos divergen hacia los polos, el microcentro forma un cuerpo alargado a modo de puente, el *centrodesmo*, a partir del cual parece originarse el huso.

La *posición* del centriolo es, por lo general, fija para cada tipo de célula. En algunas de ellas, tiende a ocupar el centro geométrico, como sucede en leucocitos con núcleos en forma de herradura, o cuando la masa nuclear es pequeña y está desplazada. No obstante, el centriolo es rechazado comúnmente por el núcleo y los productos elaborados por el citoplasma; pero, aun en estos casos, la posición puede ser relativamente fi-

TABLA 13-1. Duración de las fases mitóticas de células en división
(De D. Mazia, 1961)

<i>Célula</i>	<i>Profase</i>	<i>Metafase</i>	<i>Anafase</i>	<i>Telofase</i>
Sarcoma Yoshida (35° C)	14	31	4	21
Bazo de ratón en cultivo	20-35	6-15	8-14	9-26
Fibroblastos de hígado de <i>Tritón</i> (20°C)	18 o más	17-38	14-26	28
Neuroblastos de <i>Chorthopaga</i> (saltamontes) (38°C)	102	13	9	57
Endosperma de arveja	40	20	12	110
Endosperma de <i>Iris</i>	40-65	10-30	12-22	40-75

ja y axil. Si se traza una línea entre el centro del núcleo y el centriolo, aquélla suele coincidir con el eje de la célula. Esto es lo que ocurre en algunas células epiteliales cilíndricas, donde los centriolos se encuentran en la parte apical, debajo de la membrana.

Con el microscopio óptico se ha observado la relación del centriolo con el complejo de Golgi y las mitocondrias. Estos organoides pueden formar una corona alrededor del centriolo. En la figura 13-5 se observa que las membranas del complejo de Golgi están en la vecindad del centro celular, y pueden contribuir a la formación de la *centrosfera* del microscopio óptico.

La ultraestructura del centriolo y de las formaciones pericentriolares se estudiará en el capítulo 22.

Ciclo del centriolo durante la mitosis

Los centriolos situados en los polos del huso acromático poseen una estructura idéntica a la encontrada durante la interfase.³ Las fibras del huso terminan a cierta distancia de los centriolos y el eje de este organoide generalmente no coincide con el eje del huso (fig. 13-2). Los centriolos siempre aparecen de a pares en el curso de la interfase.

Como se aprecia en la figura 13-2, 1 a 3, durante la profase hay dos pares de centriolos, que se mueven hacia los polos mientras el huso se desarrolla entre ambos. En este esquema, la duplicación de cada uno de los centriolos polares ocurre en la telofase. El mecanismo de esa duplicación será estudia-

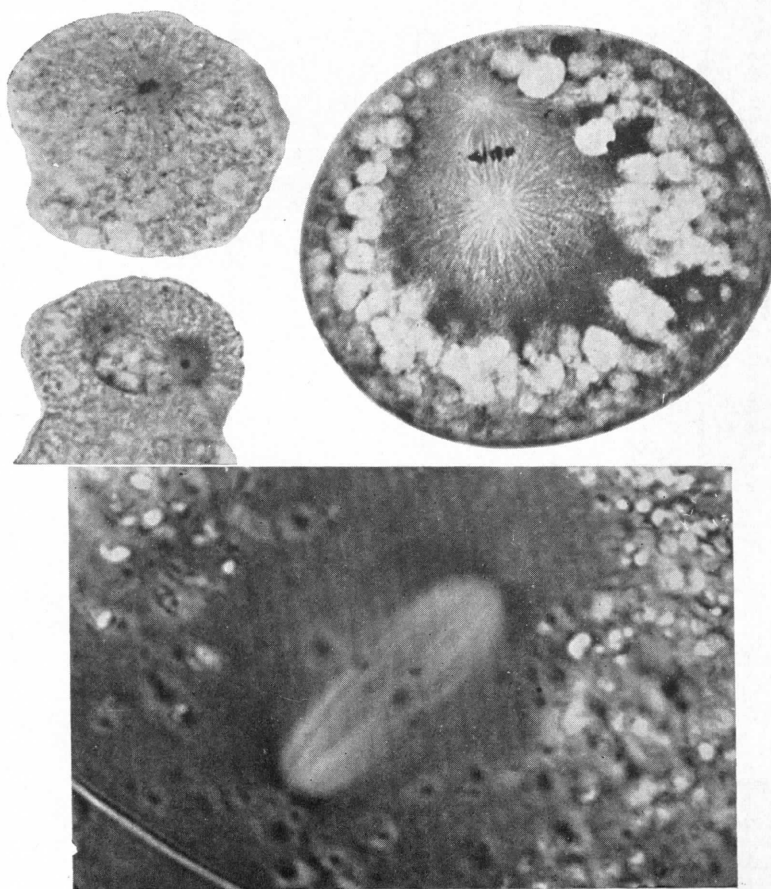


FIG. 13-4. Arriba, izquierda. Fotomicrografías de los centros celulares en huevos de *Ascaris megalocephala*. Arriba, derecha. Corte de un huevo de *Nereis limbata* que muestra el huso y los ásteres. 610 $\times$. (Cortesía de D. P. Costello.) Abajo. Aparato mitótico (ásteres y huso) en la primera división del ovocito de *Chaetopterus pergamentaceus* observado con el microscopio polarizador. Las fibras del huso tienen birrefringencia positiva. Los rayos del áster aparecen oscuros por la orientación perpendicular del huso. 1500 $\times$. (Cortesía de S. Inoué.)

do en el capítulo 22, pero como lo demuestra la figura 13-5, resulta de la inducción en ángulo recto de un centriolo hijo a partir de cada uno de estos organoides.

En la fertilización del huevo de erizo de mar (fig. 13-6, A), la duplicación de los centriolos comienza durante la fusión de los pronúcleos y se completa en la metafase. Luego, los dos centriolos hijos comienzan a dividirse de nuevo en la telofase y en la interfase siguiente. Este ciclo de los centriolos puede

ser alterado por medio de la droga *mercaptoetanol*, que inhibe la duplicación de aquéllos en la telofase (fig. 13-6, B). La consecuencia es que los cuatro centriolos se separan sin duplicarse, y al eliminar la droga, se inicia una mitosis tetrapolar, después de la cual se renueva la duplicación de los centriolos.⁴ El mercaptoetanol sólo afecta la división de los centriolos y no la separación o movimiento de ellos durante la división celular.

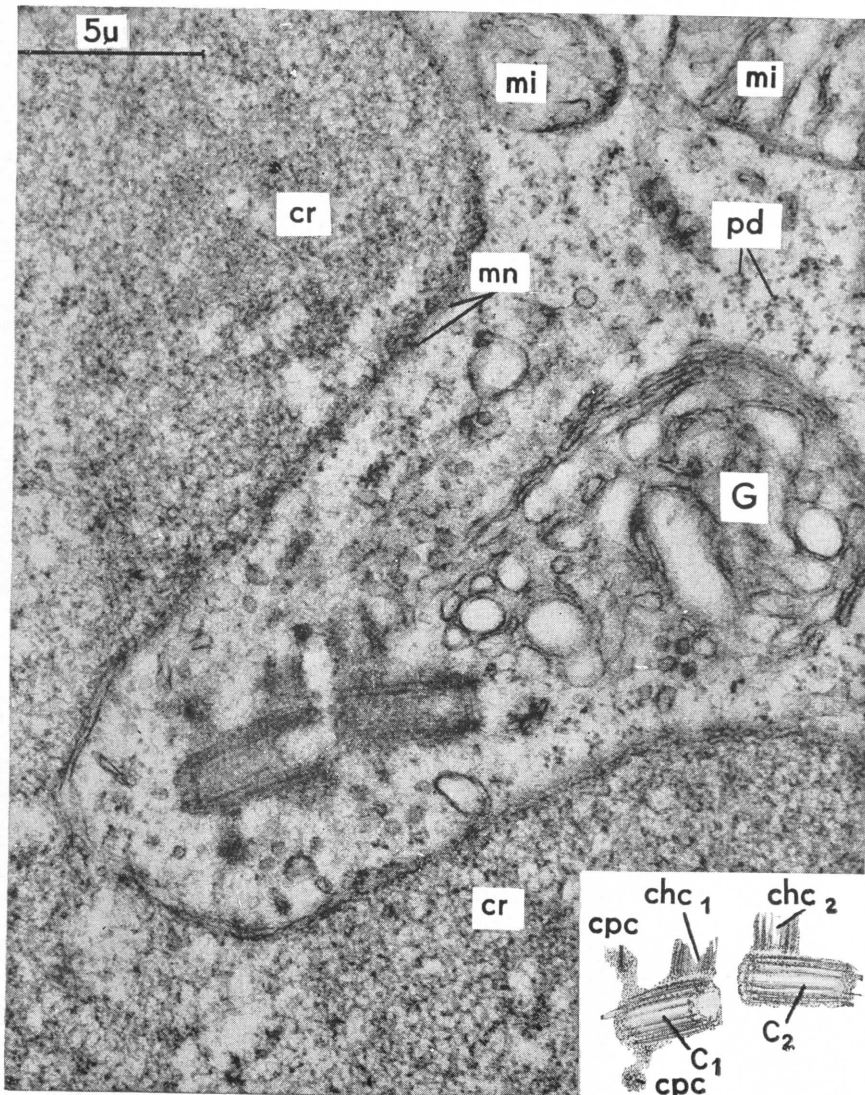


FIG. 13-5. Célula embrionaria del bazo de pollo. Los dos centriolos C_1 y C_2 se hallan en una invaginación de la membrana nuclear (mn) y en la vecindad del complejo de Golgi (G). cr , Cromatina con su estructura filamentososa; cpc , cuerpos pericentriolares; chc_2 , centriolo hijo de C_2 ; mi , mitocondria; pd , partículas densas. 60,000 $\times$. (Cortesía de E. De Harven y W. Bernhard.)

Aparato mitótico

**Ultraestructura
del aparato mitótico**

En íntima relación con la función del centro celular se encuentra el denominado "aparato mitótico" durante la división. Este término fue aplicado al conjunto de estructuras que constituyen la figura acromática en la clásica descripción de la mitosis.⁵ Dicha estructura incluye al *áster* o *astrosfera*, que rodea al centriolo, y también al *huso mitótico*.

En cada división de una célula eucarionte, se produce un huso mitótico que tiene a su cargo la orientación y separación características de los cromosomas de las dos células hijas. Al finalizar la división celular, el huso se desintegra.

La astrosfera aparece en las preparaciones fijadas como un conjunto de fibrillas refringentes que convergen radialmente hacia el microcentro y se continúan en la centrosfera (fig. 13-4). La centrosfera es también visible *in vivo* debido a su mayor refringencia, pero en este caso no se observa la estructura fibrilar del áster y su constitución parece homogénea.

Como ya se ha mencionado, pueden reconocerse mediante microscopía óptica las siguientes fibras: a) *fibras cromosómicas*, que unen los polos a los centrómeros; b) *fibras continuas*, que unen ambos polos; c) *fibras astrales*, y d) *fibras interzonales*, observadas en anafase y telofase entre grupos de cromosomas.

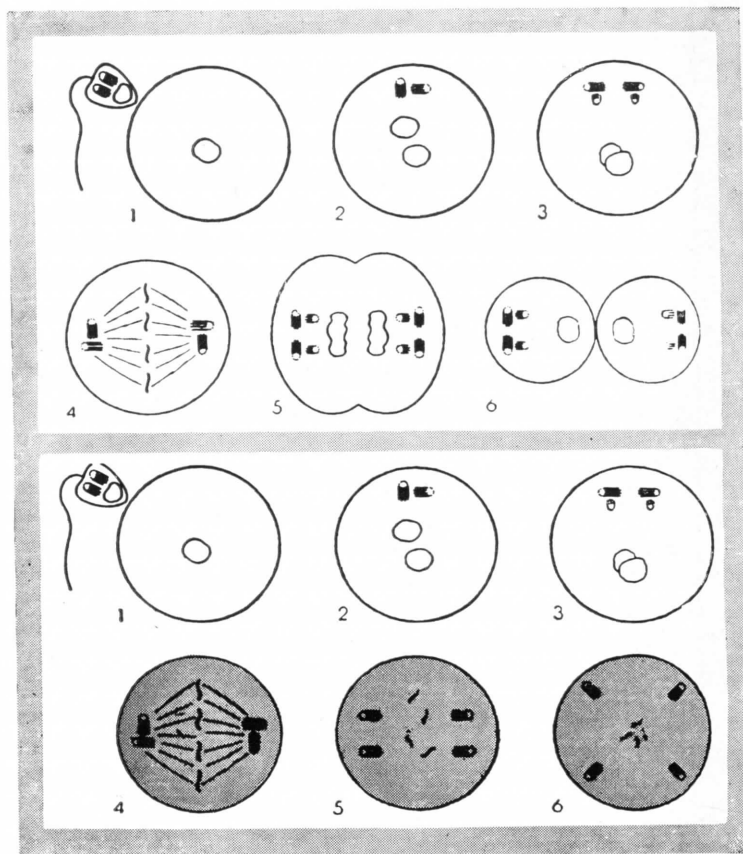


FIG. 13-6. A Reproducción normal del centriolo en un huevo de erizo de mar. 1 y 2 Fecundación y penetración de los dos centriolos; 3, fusión de los pronúcleos y comienzo de la formación de los dos centriolos hijos; 4, los centriolos están completamente duplicados; 5, telofase, comienza una nueva reproducción de los centriolos; 6, interfase. B Reproducción del centriolo después del tratamiento con mercaptoetanol. 1, 2 y 3 Lo mismo que más arriba; 4, comienzo del tratamiento en la metafase; 5 y 6, inhibición de la reproducción del centriolo. (De Mazia.)

Cambios cíclicos en la birrefringencia

Los estudios con microscopía de polarización^{6, 7} pusieron de manifiesto que las fibras del huso y los rayos astrales tienen una birrefringencia positiva del orden de 0.001μ , la cual puede demostrarse con métodos sensibles (fig. 13-4). Con ellos es posible seguir el ciclo del aparato mitótico, tanto en células animales como vegetales (figs. 13-7 y 13-8). En ambos casos se distinguen las fibras cromosómicas del huso, adheridas a los quinetocoros, y las fibras continuas. En células vegetales, que carecen de centriolos, las primeras fibras del huso surgen, en la profase, en una zona clara perinuclear (fig. 13-8, A). La birrefringencia es mayor cerca de los quinetocoros y más débil hacia los polos (fig. 13-8, B y D).

En la anafase, los cromosomas son conducidos por fibras del huso intensamente birrefringentes (figs. 13-7, C y D y 13-8, C y D). La birrefringencia de las fibras continuas aumenta en la anafase tardía y en la telofase. En células animales, estas fibras constituyen el denominado *cuerpo intermediario*, que mantiene a las dos células hijas unidas por cierto tiempo (fig. 13-7, F). En células vegetales se forma el fragmoplasto en el sitio de división (fig. 13-8, E y F).

En las diferentes células hay tres regiones que inducen la orientación de las fibras del huso: los centriolos, los quinetocoros y el fragmoplasto o placa celular. Durante el ciclo mi-

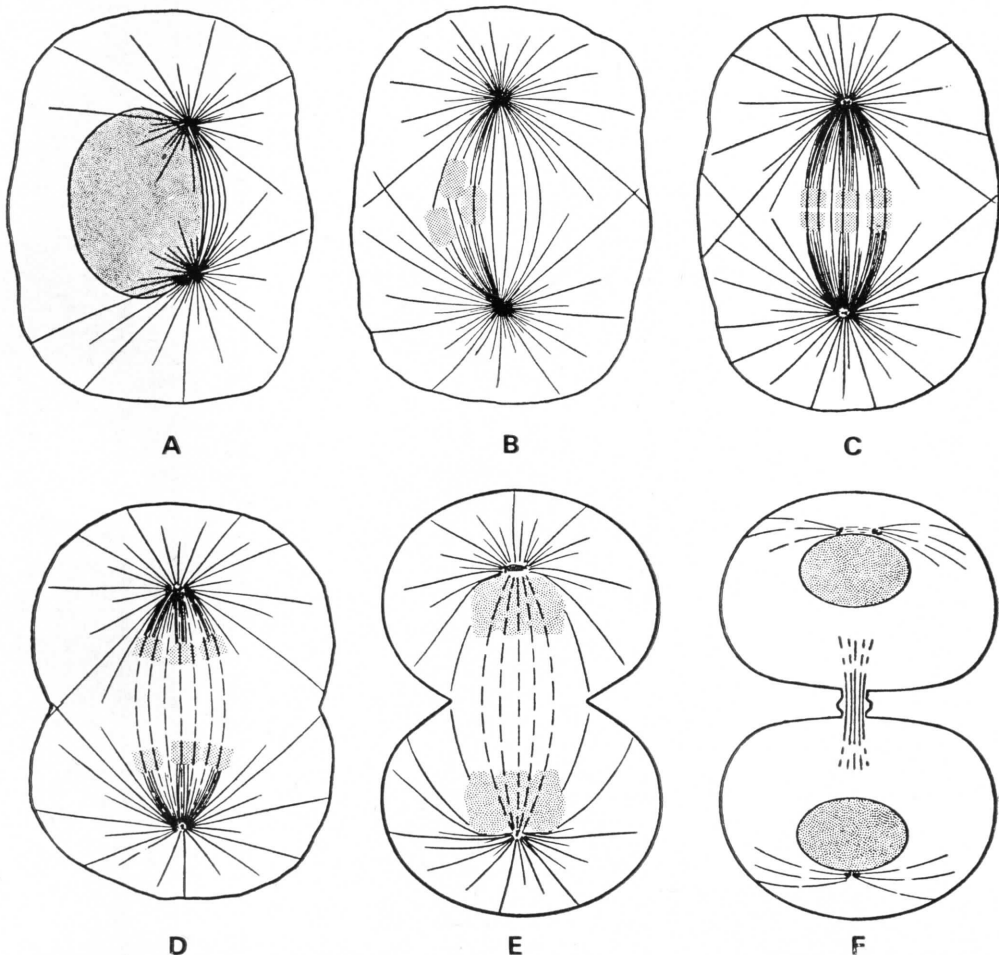


FIG. 13-7. Esquema de la mitosis en una célula animal mostrando los cambios de birrefringencia en las distintas regiones del huso. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de S. Inoué.)

tótico la actividad formadora de las fibras cambia de uno a otro de estos sitios.⁸

Los cambios cíclicos en la birrefringencia reflejan la organización y desorganización del material que constituye las fibras del huso. Mediante estudios con micromanipulación se ha comprobado que éstas pueden resistir la tracción y mantener su integridad mecánica. Puede demostrarse que las fibras del huso intervienen en el movimiento de los cromosomas, cortándolas e invirtiendo la polaridad de éstos. El quinetocoro de los cromosomas es capaz de unirse a nuevas fibras y ocasionar el desplazamiento hacia el otro polo.⁹

Los estudios en células vivientes revelan que las fibras del huso constituyen una estructura muy dinámica. La birrefringencia desaparece en pocos segundos cuando desciende la temperatura y se restablece en el curso de unos minutos al restituir las condiciones iniciales; con ello la mitosis detenida reanuda su ciclo. La birrefringencia desaparece igualmente con altas presiones hidrostáticas y con irradiación de un microhaz ultravioleta, así como también tratando a la célula con colchicina, Colcemid y otras drogas. Otro cambio interesante lo produce el agua pesada (D_2O). Colocando huevos en división en 45 por ciento de D_2O , la birrefringencia aumen-

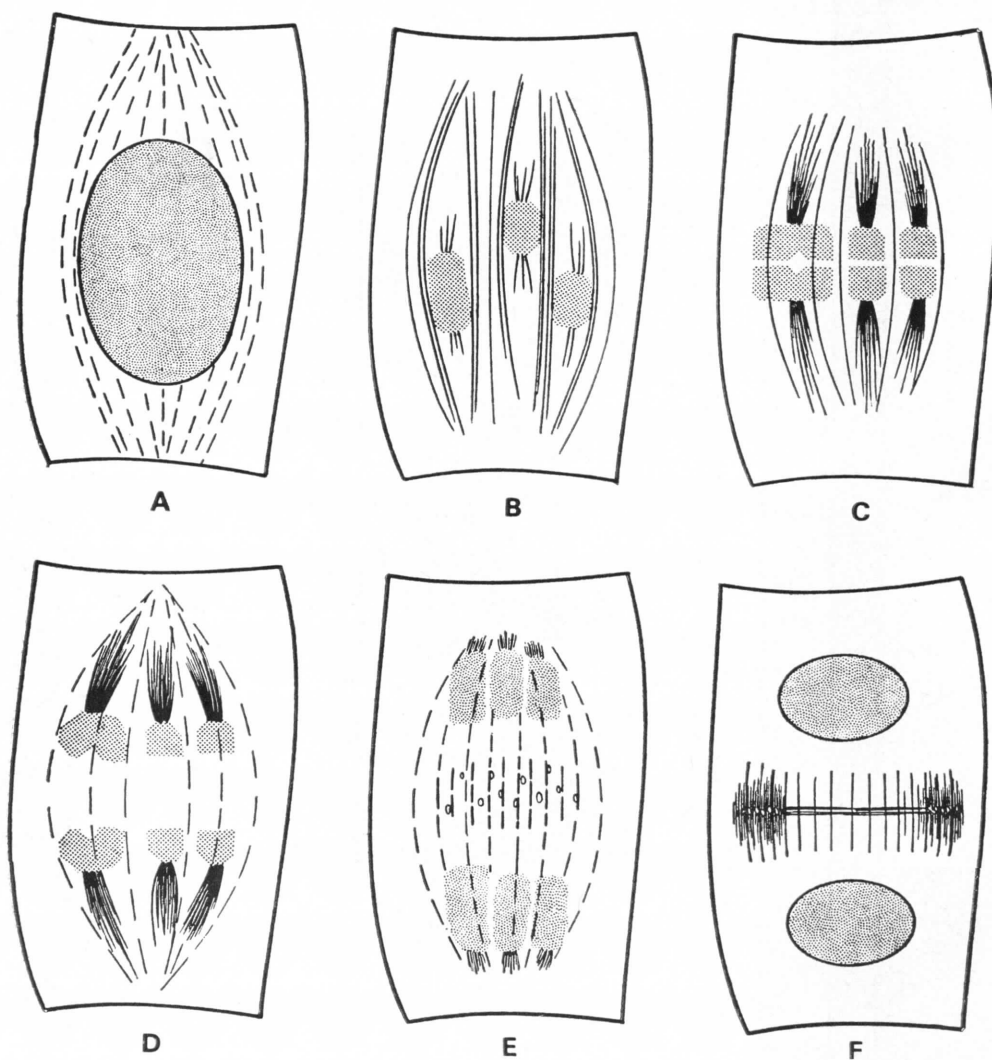


FIG. 13-8. Esquema de la mitosis en una célula vegetal mostrando los cambios de birrefringencia en las fibras del huso. Obsérvese la falta de centriolos y ásteres. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de S. Inoué.)

ta al doble y el volumen del huso diez veces, en 1 a 2 minutos (fig. 13-9). Si los huevos se reintegran nuevamente al H_2O , el huso se normaliza al cabo de pocos instantes.^{8,10,11}

Estudios con el microscopio electrónico

Los estudios con el microscopio electrónico se vieron dificultados en un comienzo por la labilidad de estas estructuras. El agregado de cationes bivalentes, especialmente de Ca^{++} , mejoraron la preservación.¹² Esta investigación y las posteriores, efectuadas en material fijado con aldehídos, permitieron establecer en todos los casos la estructura microtubular del aparato mitótico (fig. 13-10). El diámetro de los *microtúbulos* varía entre 140 y 230 Å, según la especie. Su número puede ser de sólo 16, como en la levadura,¹³ y hasta de 5000 en ciertas plantas superiores. Los microtúbulos del huso han sido estudiados por coloración negativa, demostrando ser verdaderos cilindros huecos, con subunidades proteicas globulares de aproximadamente 33 Å que forman sus paredes.^{14, 15} Las diversas observaciones sugieren que los microtúbulos provienen del agrupamiento de monómeros proteicos. En el capítulo 22, se mencionarán las semejanzas y diferencias entre estos microtúbulos y los de los cilios y flagelos.

Aislamiento y estudios bioquímicos sobre el aparato mitótico

Un progreso considerable en el estudio del aparato mitótico lo constituyó el aislamiento de este componente a partir de huevos de erizo de mar en división.⁵ Se han aplicado varios procedimientos técnicos que, en esencia, implican la fecundación de los huevos hasta alcanzar una etapa definida (generalmente la metafase de la primera división). La división se detiene por la acción del etanol al 30 por ciento y a $-10^{\circ}C$; luego los huevos son tratados con un detergente como la digitonina. De ello resulta la dispersión del citoplasma, mientras que el aparato mitótico con el áster, huso y cromosomas permanece intacto y se comporta como una sola unidad. Por un procedimiento suave de lavado y centrifugado se han podido obtener cantidades apreciables de aparatos mitóticos relativamente libres de contaminación (fig. 13-11).¹⁶ El aparato mitótico así aislado y purificado posee una birrefringencia positiva, como en la célula viva, y los cromosomas se ven claramente con el microscopio de fase. La mayor parte de la birrefringencia es del tipo de *forma* y está relacionada con la presencia de microtúbulos en los ásteres y el huso.¹⁷

El aislamiento del aparato mitótico se ha visto favorecido, en estudios recientes, por el uso de solventes no acuosos como el hexilenglicol.^{18,19}

El componente principal del aparato mitótico es una proteína relativamente homogénea a la ultracentrifugación y electroforesis, y parece estar constituida por un componente único que es responsable de la formación de las fibras del áster y del huso.

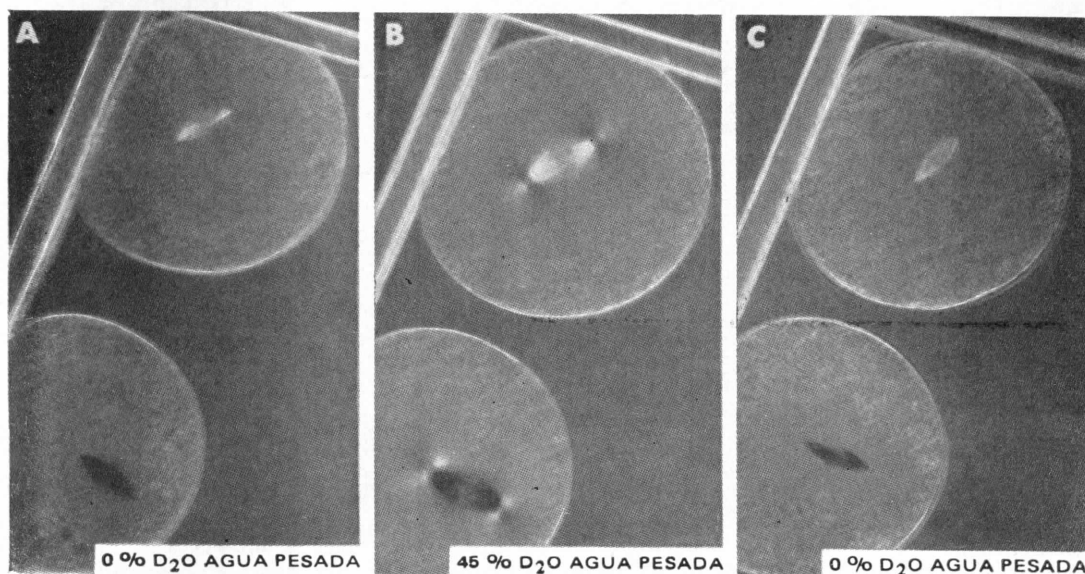


FIG. 13-9. Acción del agua pesada (D_2O), agregada al agua de mar, sobre la birrefringencia del aparato mitótico del huevo de erizo. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de S. Inoué y H. Sato.)

Existen discrepancias en lo que respecta al tamaño de dicha proteína. Usando hexilenglicol, se aisló una proteína de 22 S, con un peso molecular de 880.000.^{19,20} Representa alrededor del 95 por ciento del aparato mitó-

tico aislado, pero su tamaño es demasiado grande para que constituya las pequeñas subunidades globulares de la pared de los microtúbulos. Probablemente estas últimas sean monómeros de 2,5 S con un peso molecular



FIG. 13-10. Fotomicrografía electrónica de la región polar de una célula en mitosis, en la que se observa uno de los centriolos (Ce). Adviértase el aspecto tubular de las fibras del huso (sf) que convergen sobre el centriolo. En la parte inferior se ven dos cromosomas (Chr) y un centrómero (c). 80,000 $\times$. En el recuadro aparece un centriolo (Ce) cortado transversalmente, con 9 grupos de 3 túbulos cada uno. (Cortesía de J. André.)

de 34.700.²¹ La proteína 22 S formaría la porción gelificada del aparato mitótico aislado la cual, en volumen es diez veces mayor que el huso propiamente dicho. La proteína 2,5 S constituye específicamente las fibras del huso (microtúbulos).

Algunos hallazgos citoquímicos sugieren que los grupos $-SH$ y $-S-S-$ desempeñan un papel en la formación de las fibras del huso. Se sabe que los ásteres y el huso se tiñen intensamente con reactivos para $-SH$, mientras que durante la interfase la reacción es casi negativa^{22, 23} (fig. 13-12).

La formación de los microtúbulos mitóticos ocurriría por un mecanismo que implica, primero, la polimerización de subunidades para constituir un gel amorfo y, luego, la de los túbulos, por uniones se-

cundarias. En favor de esta hipótesis está el hecho de que la colchicina, un inhibidor mitótico, produce un gel amorfo sin birrefringencia ni fibras microscópicas.

Otras drogas como la podofilina, vincristina, vincoleucoblastina y un derivado de la colchicina (Colcemid) tienen acción similar. Las células en cultivo de tejido tratadas con Colcemid y estudiadas con el microscopio electrónico revelan un aparato mitótico aberrante formado a expensas de centriolos que no se desplazan hacia los polos. Se supone que este inhibidor impide la formación de los microtúbulos continuos del huso, necesarios para el movimiento centriolar.²⁴ En amebas que están realizando la mitosis, se ha visto que el enfriamiento ($2^{\circ}C$ durante 5 minutos) produce degradación de los microtúbulos del huso, los cuales se reconstituyen al calentar la preparación, aunque con pérdida parcial de su alineamiento paralelo.²⁵

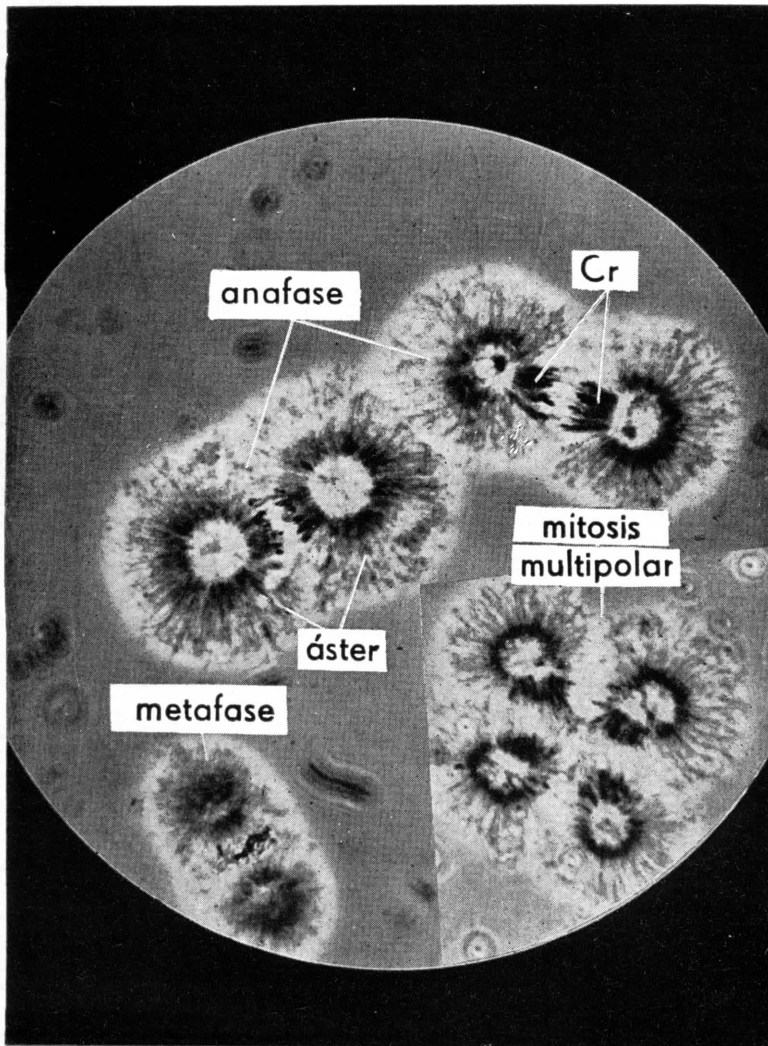


FIG. 13-11. Aparatos mitóticos aislados del huevo de erizo de mar en división. (Cortesía de D. Mazia.)

Papel del aparato mitótico

Se halla todavía en discusión el papel del huso en los movimientos anafásicos de los cromosomas. La contracción y acortamiento de las fibras del huso se producen, al parecer, en la anafase temprana. Otras evidencias sugieren que en la anafase los dos conjuntos de cromosomas hijos son apartados por un alargamiento de las fibras del huso entre los polos (teoría del *cuerpo impulsor*). Por tanto, los movimientos anafásicos comprenden, por un lado, a las fibras cromosómicas y, por el otro, a las fibras continuas. Estos dos tipos de movimientos participan en una proporción más o menos similar, de acuerdo con el tipo celular.^{26,27}

El alargamiento del huso fue obtenido por acción del ATP sobre fibroblastos extraídos con glicerol en la anafase, acentuándose con ello la emigración de los cromosomas hacia los polos.²⁸

En la profase, el desplazamiento de los centriolos es debido, probablemente, al "empuje" que ejercen las fibras continuas.²⁹ En fibroblastos, la separación de los centriolos se realiza con una velocidad de 0.8 a 2.4 μ por minuto.³⁰ Tan pronto como la membrana nuclear comienza a desintegrarse al final de la profase, la región nuclear es invadida por microtúbulos que establecen uniones quinetocoro-polares antes que los cromosomas se dirijan a la placa metafásica.³¹ Los estudios microquirúrgicos sugieren que el traslado de un par de cromátidas hacia el polo correspondiente,

depende de la presencia de discos quinetocóricos hermanos en direcciones opuestas.³² Que la fuerza responsable del movimiento cromosómico hacia los polos es transmitida por los quinetocoros, constituye una evidencia reconocida desde hace tiempo, por la forma característica que los cromosomas adoptan en la metafase y la anafase, y también por los puentes anafásicos que resultan del estiramiento de los cromosomas dicéntricos. Las fuerzas implicadas pueden ser tan intensas que originan la ruptura de los cromosomas dicéntricos.

Se ha propuesto que las fibras cromosómicas del huso provienen del centrómero de cada cromosoma y crecen hacia los polos de las células.³³ El hecho de que fragmentos cromosómicos que carecen de centrómero no experimentan movimientos anafásicos, confirma la importancia de las fibras del huso en su producción. Sin embargo, es difícil admitir que la contracción real de las fibras cromosómicas del huso sea la causa de su movimiento. Las fibras no se han visto engrosar con el acortamiento, sino más bien "fundirse" en la región de la centrosfera. Observaciones *in vivo* tienden a indicar que hay un transporte continuo de material entre el ecuador y los polos durante la anafase, como en el caso de un mecanismo del tipo cinturón sin fin.^{34, 35}

Probablemente uno de los mejores modelos para explicar el papel del huso es el propuesto por Inoué.⁸ De acuerdo con él, existe un balance entre los monómeros y los polímeros orientados que constituyen las fibras del huso o microtúbulos. Durante la polimerización, se supone que el agua estructurada

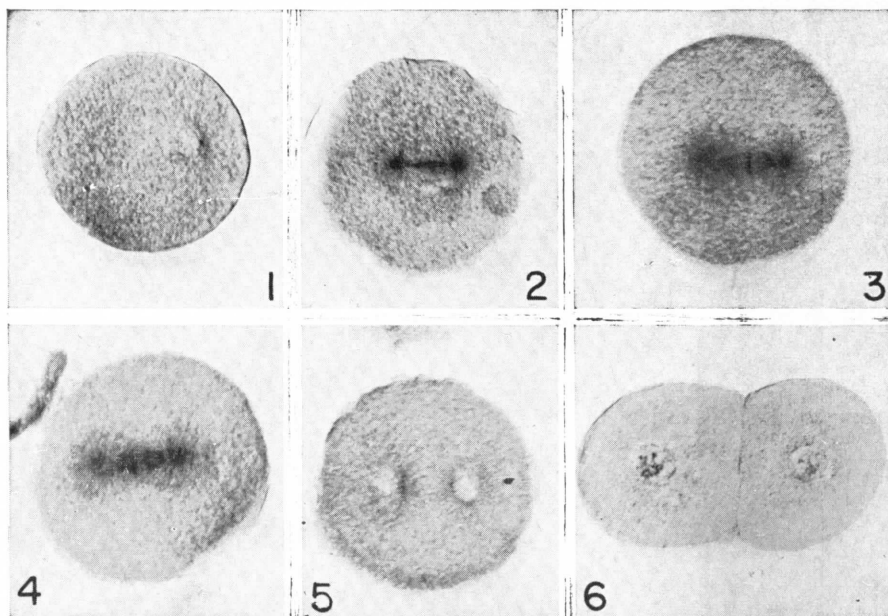


FIG. 13-12. Grupos sulfhidrilos coloreados con el reactivo de Bennett en la primera división del huevo de erizo de mar. 1 Tres minutos después de la fecundación. 2 Profase. 3 Metafase. 4 Anafase. 5 y 6 Telofase. (Cortesía de N. Kawamura y K. Dan.)

se disocia, lo cual explicaría el aumento de la birrefringencia inducido por el D₂O (véase más arriba). Este equilibrio dinámico es también muy sensible a cambios de temperatura y a la acción de solventes no acuosos, indicando la importancia de las interacciones hidrófobas entre los grupos no polares de los monómeros proteicos.^{8, 18, 19} Se cree que la contracción y alargamiento de las fibras del huso son responsables de los movimientos cromosómicos durante la mitosis. Estos cambios lineales derivan de la adición o sustracción de nuevos monómeros. La contracción de las fibras cromosómicas en la anafase se debería a la remoción de monómeros, en especial los de la región polar, con el consecuente acortamiento de la fibra y la tracción de los cromosomas hacia los polos.⁸

Citocinesis o segmentación celular

La división nuclear y la citocinesis pueden constituir dos procesos separados. Por ejemplo, en los *plasmodios* multinucleares de los huevos de insectos la división de los núcleos puede no acompañarse de la separación citoplásmica. El mecanismo de la citocinesis es distinto en la célula animal que en la vegetal. En la última, la formación del fragmoplasto y de la placa celular lleva a la división de los territorios citoplásmicos sin formación de un surco (véase cap. 12). La segmentación de las células animales ha sido estudiada principalmente en células cultivadas en huevos y, más recientemente, en modelos celulares. Como consecuencia de estos estudios se han invocado diversos mecanismos posibles, que se refieren tanto al aparato mitótico (áster y huso) como a la corteza citoplásmica.¹

En la división normal existe una coordinación perfecta entre el movimiento cromosómico y la posición del surco (o la placa celular). En fragmentos de huevos en los cuales el núcleo se eliminó por centrifugación (fig. 2-3) quedó demostrado que la citocinesis podía producirse. La importancia de los centros del huso fue inferida de estudios sobre divisiones en células multipolares, en las que se forma un surco entre cada par de centros celulares. Sin embargo, aun la extracción de todo el aparato mitótico de huevo de erizo de mar no inhibe la citocinesis,²⁹ como así tampoco la disolución del aparato mitótico con colchicina o su desplazamiento mecánico.³⁶ Algunos autores

sugieren que los centros celulares podrían empujar la superficie celular mediante los rayos astrales, o bien que el aparato mitótico da una señal para la citocinesis.³⁷

Las hipótesis que se refieren a la corteza celular, incluyen la contracción del gel cortical, la expansión o crecimiento de las membranas o un proceso ameboides activo.^{28, 38, 39} Si tiene lugar la contracción activa de la corteza, debería existir una proteína contráctil similar a la del músculo.

Algunos experimentos con modelos celulares confirman esta posibilidad; en efecto, el agregado de ATP a fibroblastos extraídos con glicerol en etapas tempranas de la citocinesis, permitió la finalización de ésta.^{40, 41} Más aún, de huevos de erizo de mar se aisló una proteína contráctil que posee actividad de ATPasa y propiedades semejantes a la actomiosina.⁴²

Estos experimentos pueden correlacionarse con otros resultados que demuestran que el ATP es susceptible de ocasionar contracción citoplásmica en diferentes tipos celulares. Las fibras artificiales obtenidas a partir de estas proteínas corticales son capaces de contraerse y alargarse en una reacción de transferencia electrónica que implica a los grupos SH.⁴³

En resumen: para las células animales las teorías de la citocinesis hacen hincapié en los mecanismos siguientes: 1) movimiento ameboides; 2) anillo ecuatorial contráctil; 3) expansión de la membrana celular, y 4) interacción del huso y del áster con la superficie celular.²¹ Para las células vegetales, son factores esenciales de la citocinesis normal los movimientos del retículo endoplásmico y de los dictiosomas, así como la fusión de material vesicular en el plano ecuatorial (véase capítulo 12).

MEIOSIS

La meiosis sólo tiene lugar en las células germinativas de los animales y vegetales que se reproducen sexualmente. En ambos casos estas células se localizan en las gónadas.

Células germinativas de los animales

Después de repetidas divisiones, el cigoto origina las células somáticas y las germinativas (fig. 13-13). Estas últimas, por divisiones sucesivas, producen varias generaciones de *gonocitos*, que tras un período variable se transforman en células *goniales* primarias. De ellas proceden las *espermatogonias* en el macho y las *ovogonias* en la hembra.

Luego, por división de la célula gonial primaria, se desarrollan células goniales secundarias. Cada espermatogonia secundaria origina, en una división final, dos células hijas que comienzan a aumentar de volumen y se denominan espermatoцитos primarios o *espermatoцитos I*. La división del *espermatoцитo primario* (primera división meiótica) da lugar a dos células hijas o *espermatoцитos secundarios*, que se dividen nuevamente (segunda división meiótica), resultando cuatro células o *espermátides*.

Estas, por diferenciación (espermiogénesis) se convierten en *espermatozoides*.

En la hembra, las etapas sucesivas son las de ovogonia, ovocitos primarios, ovocitos secundarios, ovótidas y óvulos. En vez de cuatro gametos funcionales se produce solamente uno, el *óvulo* maduro, puesto que los otros tres se

convierten en *polocitos* infértiles o *cuerpos polares*.

Células germinativas de plantas fanerógamas

En los vegetales superiores, las primeras células de la línea germinativa derivan del cigoto y se multiplican por mitosis. Los órganos reproductores —antera en el macho y ovario o pistilo en la hembra— forman, respectivamente, microsporos y megasporos. Las células que experimentan meiosis para constituir megasporos se denominan megasporocitos. Los microsporos proceden, a su vez, de microsporocitos (células maternas del polen). Cada microsporocito proporciona por meiosis cuatro microsporos funcionales. De cada megasporocito se originan por meiosis cuatro megasporos, tres de los cuales degeneran. El megasporo restante se desarrollará en gametofito femenino, que dará lugar a la célula huevo (fig. 13-14). Tanto en vegetales como en animales pueden existir muchas variaciones en la localización y diferenciación de la línea germinativa, pero en general el proceso meiótico es similar en ambos reinos.

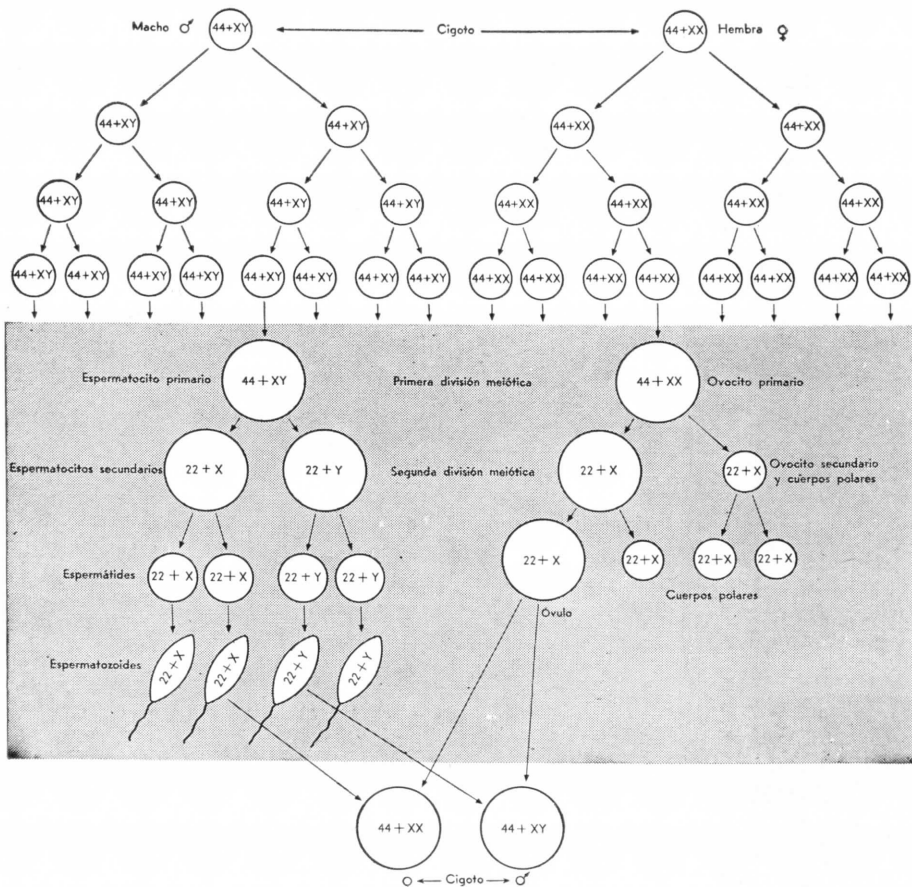


FIG. 13-13. Esquema de la espermatogénesis y de la ovogénesis en el ser humano. Arriba. Mitosis de células goniales. En el medio (gris). Divisiones meióticas. Abajo. La fecundación y el cigoto. Se indican los 44 autosomas y los cromosomas sexuales.

En los vegetales, los microsporos y los megasporos no son los gametos finales. Antes de la fecundación, sufren dos divisiones mitóticas en la antera y tres en el ovario que producen, respectivamente, los gametofitos masculinos y femeninos (fig. 13-14). El período durante el cual ocurre la meiosis en el ciclo vital, varía según los diferentes organismos pero es constante para cada especie.

Análisis de la meiosis

Como se mencionó en el capítulo 3, la esencia de la meiosis consiste en dos divisiones celulares con una sola duplicación de los cromosomas. El resultado de este proceso es la formación de cuatro núcleos, cada uno de los cuales tiene un número simple o haploide de cromosomas. Las dos divisiones se denominan primera división meiótica y segunda división meiótica, o simplemente I y II (fig. 13-13).

La primera división meiótica se caracteriza por una larga profase, durante la cual los cromosomas homólogos se aparean íntimamente y efectúan un intercambio de material hereditario. Las fases clásicas de la mitosis no bastan para describir de manera completa los movimientos complejos de los cromosomas en la meiosis. Los estadios sucesivos se verifican en el siguiente orden:

MEIOSIS

División I

Profase I

Preleptonema
Leptonema
Cigonema
Paquinema
Diplonema
Diacinesis

Prometáfase I
Metáfase I
Anáfase I
Telófase I

Interfase

División II

Profase II
Metáfase II
Anáfase II
Telófase II

División meiótica I

El estadio *preleptonémico* corresponde a la profase temprana de la mitosis. Los cromosomas son extremadamente finos y difíciles de observar. Solamente los cromosomas sexuales

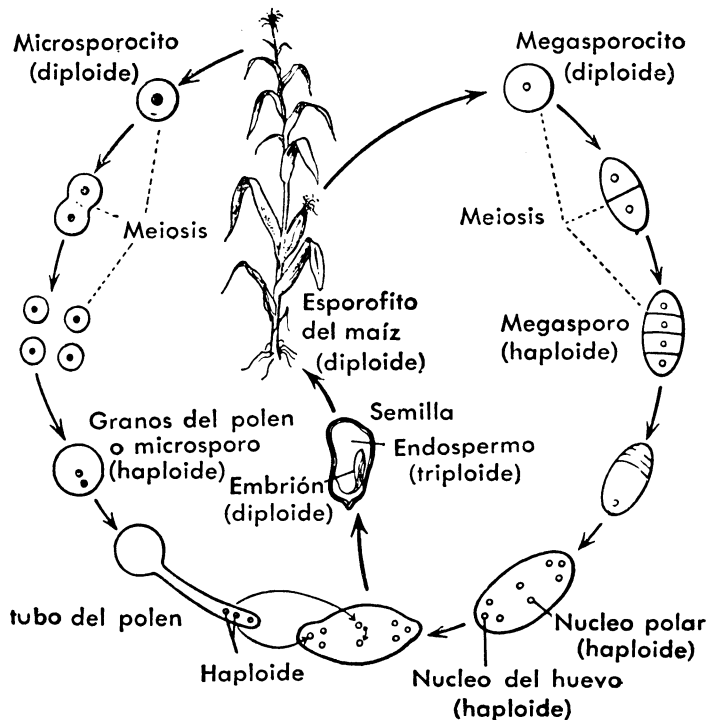


FIG. 13-14. Ciclo vital de una planta fanerógama. (Según Sinnott, Dunn y Dobzhansky, 1958.)

pueden destacarse como cuerpos compactos heteropicnóticos.

En el estadio de *leptonema* (fig. 13-15, 1) los cromosomas aparecen, con más nitidez, como largos filamentos que presentan cromó-

meros. Frecuentemente, los cromosomas leptotónicos poseen una orientación definida y una polarización en dirección de los centriolos. Esta disposición peculiar se denomina "bouquet".

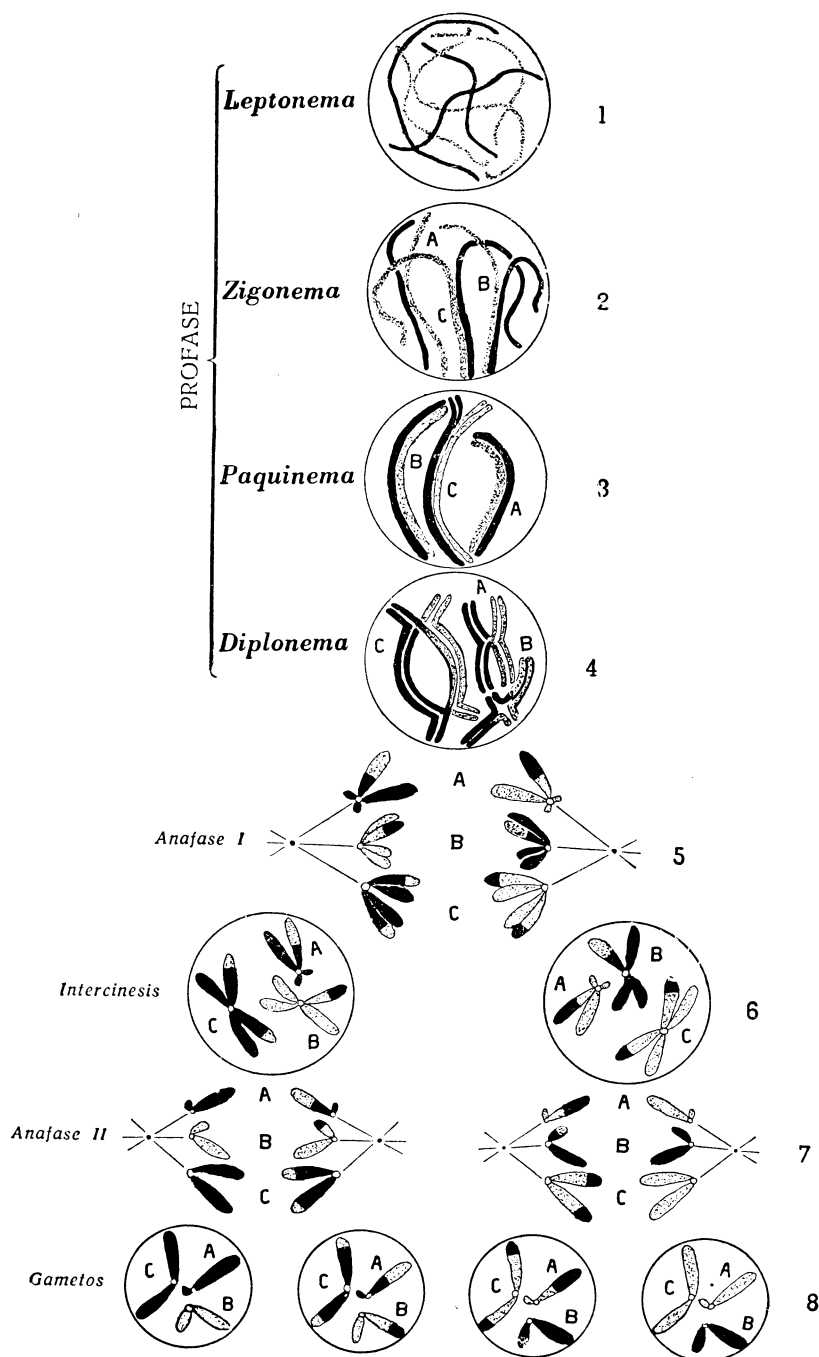
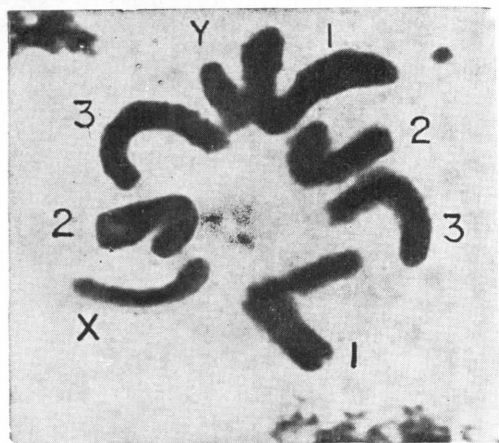
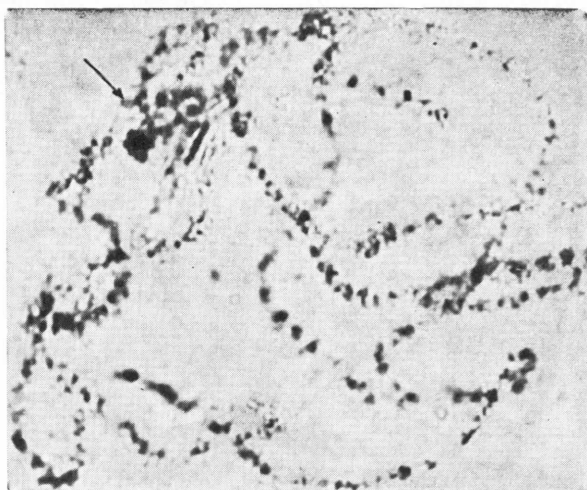


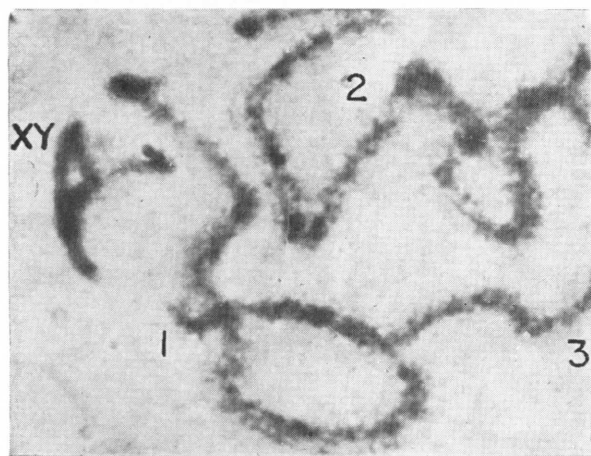
FIG. 13-15. Esquema general de la meiosis, que ilustra la unión, intercambio, separación y distribución de los cromosomas.



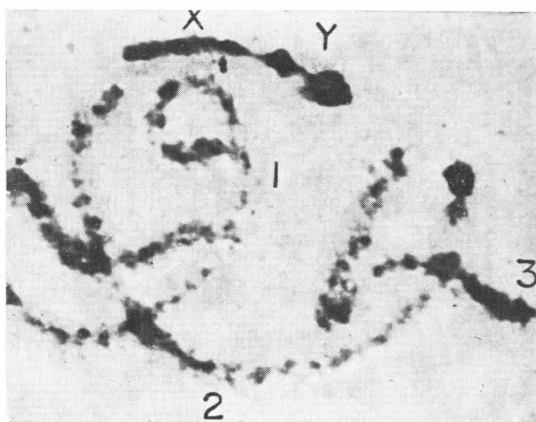
A



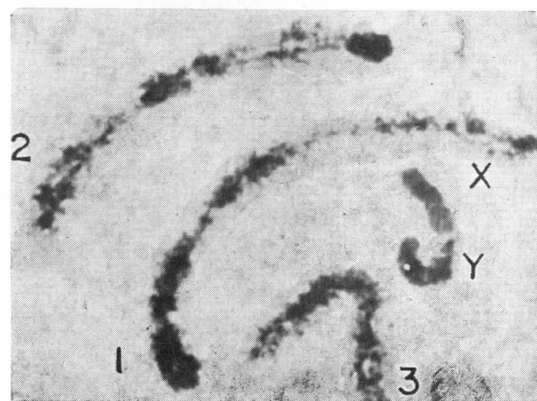
B



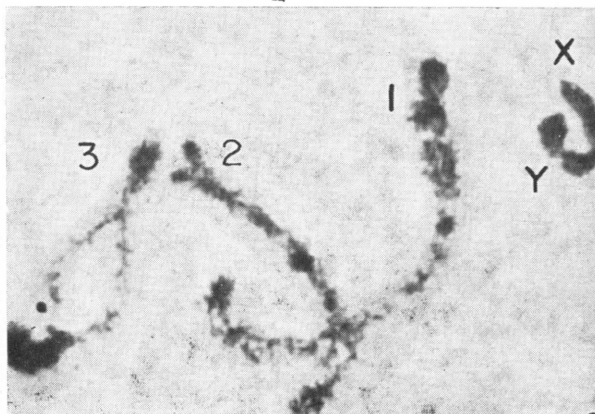
C



D

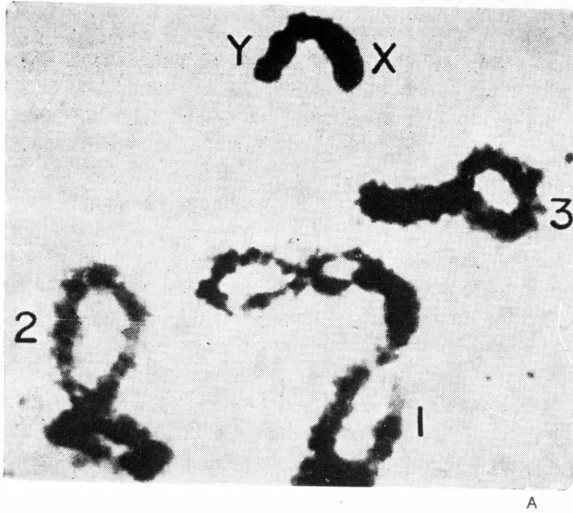


E

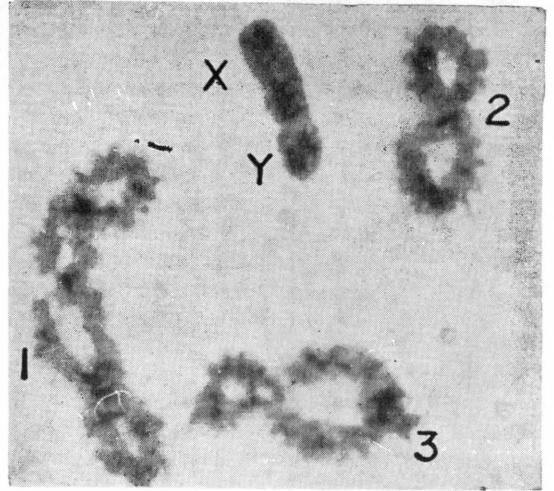


F

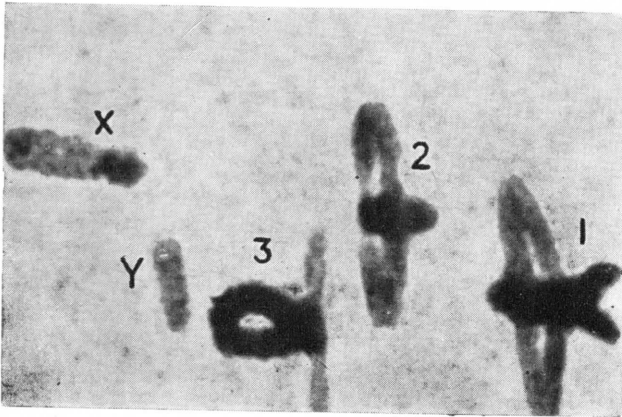
FIG. 13-16. *Etapas de la meiosis como se observa en la langosta sudamericana Dichroplus silveira guidoi* ($2n = 8$). A Metáfase de espermatogonia en vista polar, con los tres pares de autosomas (1, 2, 3) y los cromosomas sexuales (XY). B Paquinema temprano: los cromosomas homólogos se han apareado; el par XY está indicado con una flecha. C Paquinema, con los tres bivalentes autosómicos (1, 2, 3) y el bivalente sexual XY. D Paquinema: comienza el acortamiento de los bivalentes; los dos componentes del par XY manifiestan acentuada heteropícnosis positiva. E Fin del paquinema: se observa la diferenciación lineal de los bivalentes; los cromosomas sexuales se han acortado manteniendo su heteropícnosis positiva. F Diplonema temprano: los cromosomas homólogos comienzan a separarse por sus extremos y continúa la condensación de los cromosomas sexuales. (De F. A. Sáez.)



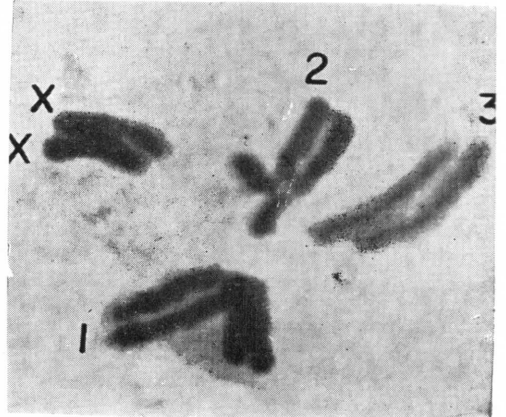
A



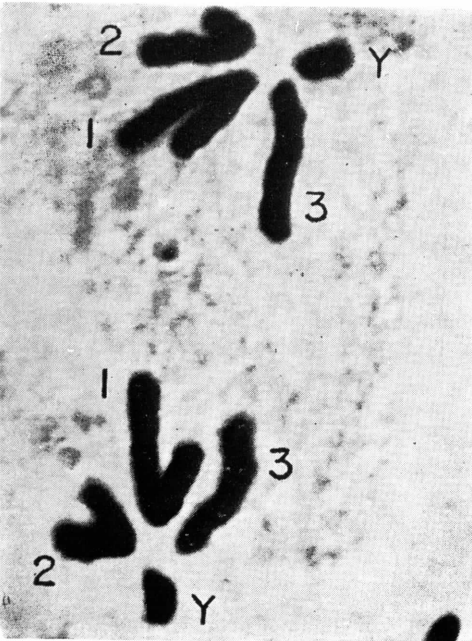
B



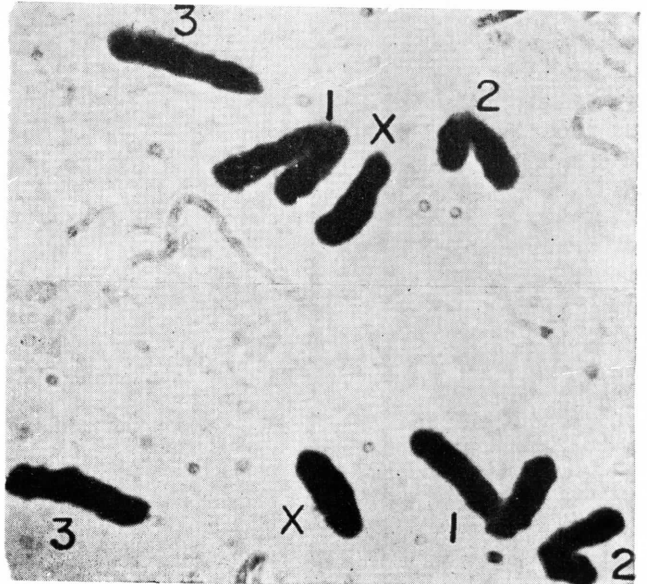
C



D



E



F

Al comienzo del estadio de *cigonema* (fig. 13-15, 2) se inicia el apareamiento de los cromosomas homólogos. Unas veces se unen por sus extremos polarizados y el apareamiento prosigue hasta la extremidad antipolar; en otros casos, la fusión ocurre simultáneamente en varios puntos a lo largo del filamento (apareamiento localizado). Parece ser que la presencia de un "bouquet" y la polarización en general favorecen la regularidad del apareamiento. Este es muy exacto y específico: sucede en cada uno de los homólogos punto por punto, cromómero por cromómero.

En el estadio de *paquinema* (fig. 13-15, 3), cuando se completa el apareamiento de los cromosomas leptonémicos, ocurre una contracción longitudinal que da lugar a la formación de filamentos más cortos y gruesos. En este momento, con la ayuda de técnicas refinadas, puede observarse la constitución doble de los filamentos (fig. 13-16). Promediando esta etapa, el núcleo contiene la mitad del número de cromosomas, pero esa reducción es sólo aparente, ya que cada unidad es un *bivalente* o *tétrada* compuesta por los dos cromosomas homólogos en íntima unión longitudinal.

Cada cromosoma homólogo tiene su centrómero, de modo que en cada bivalente existen dos centrómeros. Hacia la mitad del paquinema se hace visible una segmentación longitudinal en cada uno de los homólogos, en un plano perpendicular al del apareamiento. Ello significa que cada elemento paquiténico está compuesto por cuatro cromátidas. Las cromátidas de cada cromosoma homólogo se denominan cromátidas hermanas (fig. 13-19).

Simultáneamente con la segmentación longitudinal del cromosoma, se producen fracturas trasversales en dos de las cromátidas homólogas, al mismo nivel. Esto es seguido de un intercambio de segmentos que se lleva a cabo entre cromátidas homólogas y consiste primero en una ruptura, luego en una trasposición y por último en una fusión de los segmentos.

En el estadio de *diplonema* (figs. 13-16 y 13-19), después del desdoblamiento longitudinal de cada cromosoma homólogo, los pares comienzan a separarse, repeliéndose entre sí. Sin embargo, la separación no es completa, ya que los cromosomas homólogos permanecen unidos por los puntos de intercambio o *quiasmas*. A éstos se los considera generalmente como la expresión de un fenómeno genético denominado *crossing-over*, por medio del cual los segmentos cromosómicos con ciertos bloques de genes se intercambian entre los miembros homólogos de los pares.

En este momento es necesario aclarar los términos *crossing-over* y *quiasma*. El *crossing-over* constituye un fenómeno genético de intercambio o recombinación que se produce al nivel molecular, y *quiasma* es la manifestación de ese proceso subyacente que puede observarse mejor en el diplonema. Por tanto, el quiasma es en general la consecuencia del *crossing-over*.

Con pocas excepciones, los quiasmas se hallan en todos los vegetales y animales. Por lo menos se forma un quiasma por cada bivalente (fig. 13-17). Su número es variable, puesto que pueden existir cromosomas que tienen un quiasma y otros que poseen varios.

En el estadio de *diacinesis* existe una contracción acentuada de los cromosomas. Entre tanto, el proceso de *terminalización*, que es el movimiento de desplazamiento de los quiasmas a lo largo del cromosoma, desde el centrómero hasta sus extremos, continúa, mientras que el número de quiasmas intersticiales disminuye. Las cromátidas permanecen conectadas por medio de los quiasmas terminales hasta la metafase (fig. 13-19).

En la *prometáfase I*, la espiralización llega prácticamente a su máximo, la membrana nuclear desaparece y los cromosomas se ordenan en el ecuador de la célula para iniciar la *metafase I*. En este estadio, los dos miembros de cada par de homólogos se encuentran con sus centrómeros dirigidos hacia los polos opuestos (fig. 13-17). Se acentúa la repulsión de los centrómeros y cromosomas, y cada

FIG. 13-17. Continuación de la figura 13-16. A Diplonema, con los quiasmas de cada bivalente; los cromosomas sexuales presentan un alto grado de condensación (heteropicnosis positiva). B Fin del diplonema: se observan claramente los quiasmas de los bivalentes autosómicos; los cromosomas sexuales se encuentran aún en heteropicnosis positiva. C Metafase I en vista lateral: cada bivalente autosómico muestra la típica configuración correspondiente a los cromosomas metacéntricos (1 y 2) y acrocéntricos (3); los cromosomas X y Y evidencian ahora heteropicnosis negativa y están en la anafase temprana. D Metafase II en vista polar: cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas (incluyendo el X). E y F Anafase II en vista lateral: los cromosomas están constituidos por una sola cromátida. Como resultado de esta división se forman dos espermátidas con cromosomas Y (E) y dos con cromosomas X (F). (De F. A. Sáez.)

cromosoma está listo para separarse. Si el bivalente es largo, presenta una serie de aberturas entre los quiasmas, en planos alternados. Si los cromosomas son cortos, tienen una sola abertura de forma anular.

En la *anafase I* (fig. 13-17), las cromátidas

hijas de cada homólogo, unidas por sus centrómeros, se dirigen a los respectivos polos. Los cromosomas cortos, conectados casi siempre por un quiasma terminal, se separan rápidamente. Los cromosomas largos, con quiasmas intersticiales y no terminalizados, se retrasan

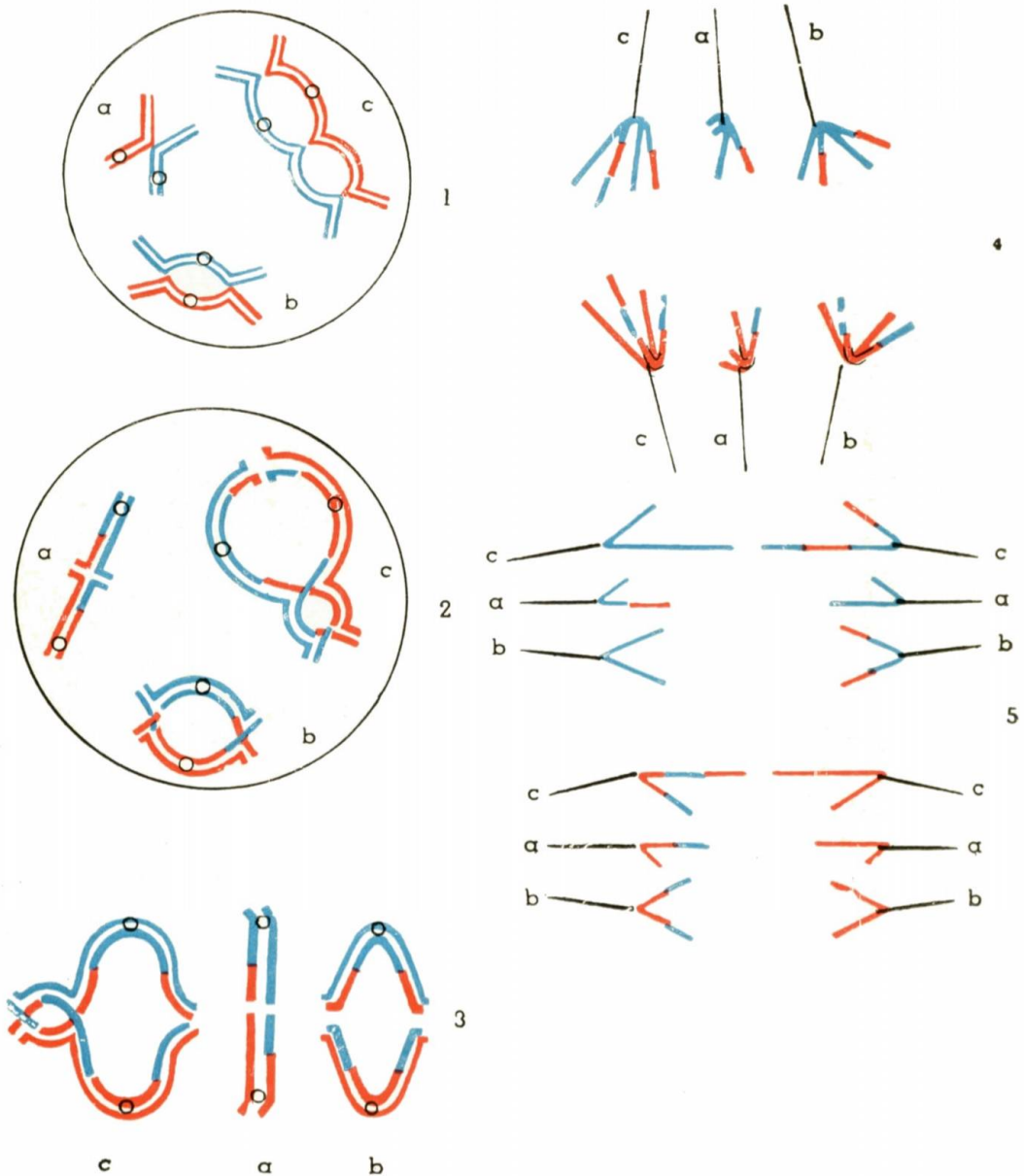


FIG. 13-18. Esquema que ilustra las consecuencias genéticas de la meiosis de tres pares de cromosomas con un quiasma (a), con dos quiasmas (b) y con tres quiasmas (c). 1 Diploténico. 2 Diploténico avanzado mostrando el proceso de terminalización. 3 Metafase I. 4 Anafase I. 5 Anafase II, con la distribución de los cromosomas en los cuatro núcleos que van a formarse. En rojo se representan los cromosomas paternos y en azul los maternos. El centrómero está indicado por un círculo.

en su separación. Vistos de perfil, los cromosomas anafásicos presentan diversas formas que dependen de la posición del centrómero. Debe recordarse que por medio de los quiasmas se produjo una transferencia de segmentos entre una de las dos cromátidas de cada homólogo. De ese modo, cuando los cromosomas homólogos paternos y maternos se separan en la anafase poseen diferente composición de la de los originales. Dos de sus cromátidas son mixtas y las otras dos conservan su naturaleza inicial (figs. 13-15 y 13-18).

La *telofase I* comienza tan pronto como los grupos anafásicos llegan a sus respectivos polos. Los cromosomas pueden persistir condensados por algún tiempo, evidenciando todos sus caracteres morfológicos. Después de la telofase existe un corto período de interfase que tiene características similares a la interfase de la mitosis. Algunas veces la interfase es de larga duración. El resultado de la primera división meiótica es la formación de los núcleos hijos, que en los animales se denominan espermatoцитos II (en el macho) y ovocito II, más el primer cuerpo polar (en la hembra).

División meiótica II

A una corta *profase* sigue la formación del huso, que marca el comienzo del siguiente estadio. En la *metafase* el número de cromosomas es la mitad del número somático. Los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial, los centrómeros se dividen y las dos cromátidas hijas se dirigen a los polos opuestos durante la *anafase II* (fig. 13-17). Como en esta división se han separado las mitades longitudinales (cromátidas) de cada cromosoma

paterno, cada uno de los cuatro núcleos de la telofase II tendrá una cromátida, que ahora se denomina cromosoma. Cada núcleo posee un número haploide de cromosomas, en el cual cada cromosoma está representado una sola vez (figs. 13-15 y 13-17).

La esencia del proceso meiótico es la formación de los cuatro núcleos, cada uno diferente de los otros, en el que cada cromosoma de los padres está representado una sola vez. Como consecuencia de los *quiasmas* con los *crossing-over*, los cromosomas no suelen estar compuestos enteramente por cromosomas maternos y paternos sino por segmentos alternados de cada uno. Por ejemplo, en la figura 13-18, todos los segmentos del cromosoma A efectúan una reducción o división de segregación entre los centrómeros y el quiasma, en la anafase I, y una división ecuacional, en la anafase II. Por el contrario, los segmentos localizados entre el extremo distal del cromosoma y el quiasma efectúan una reducción en la anafase II.

De este modo, la meiosis es un mecanismo destinado a la distribución de las unidades hereditarias o genes, permitiendo su recombinación independiente y al azar. El *crossing-over* proporciona un medio por el cual los genes que se encuentran en diferentes cromosomas pueden intercambiarse y recombinarse. Si este proceso no ocurriera, la evolución de las especies se habría suspendido por tener cromosomas inalterables y la naturaleza viviente estaría privada de su diversidad característica.

El estudio de la meiosis es un requisito previo para la comprensión de las bases cromosómicas de la Genética. En ese momento (véa-

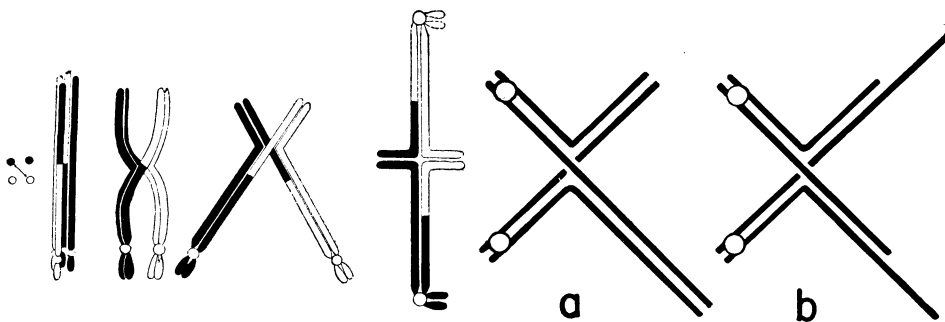


FIG. 13-19. Esquema que explica el proceso del *crossing-over* (1 y 2), formación de quiasmas (3), terminalización (4) y rotación de las cromátidas de un bivalente (5). Derecha. Pruebas de la teoría de la quiasmática. Si se forma un solo quiasma entre las dos cromátidas desiguales en un par de cromosomas heteromórfico, la separación anafásica tendrá lugar como se indica en *a* y no como está representada en *b*.

se cap. 14) se percibirá la verdadera significación de la meiosis como fenómeno hereditario.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Dan, K.: (1963) Force of cleavage of the dividing sea urchin egg. In: *Cell growth and cell division. Symposia of the Internat. Soc. Cell Biology*, vol. 2. (Harris, R. J. C., ed.) Academic Press, New York.
- Dan, K.: (1966) Behavior of sulphhydryl groups in synchronous division. In: *Cell Synchrony*. Academic Press, New York.
- Fautrez, J.: (1963) Dynamisme de l'ana-telophase et cytodierèse. In: *Cell growth and cell division. Symposia of the Internat. Soc. Cell Biology*, vol. 2. (Harris, R. J. C., ed.) Academic Press, New York.
- Harris, R. J. C. (ed.): (1963) *Cell growth and cell division. Symposia of the Internat. Soc. for Cell Biology*, vol. 2. Academic Press, New York.
- Hoffmann-Berling, H.: (1960) Other mechanisms producing movements. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2:341.
- Hughes, A.: (1952) *The mitotic cycle*. Academic Press, New York.
- Inoué, S.: (1964) Organization and function of mitotic Spindle. In: *Primitive motile systems in cell Biology*. (R. Allen and N. Kamuya, ed.) Academic Press, New York, p. 549.
- Inoué, S. and Sato, H.: (1967) Cell motility by labile association of molecules. *J. gen. Physiol.*, 50: 259.
- Kane, R. E.: (1967) The mitotic apparatus. *J. Cell Biol.*, 32:243.
- Mazia, D.: (1961) Mitosis and the physiology of cell division. In: *The cell*, vol. 3, p. 77. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Mazia, D.: (1961) How cells divide. *Scient. Amer.*, 205:100.
- Scharer, F.: (1944) *Mitosis*. Columbia University Press, New York.
- Stephens, R. E.: (1967) The mitotic apparatus. *J. cell Biol.*, 32:255.
- Swann, M. M. and Mitchison, J. M.: (1958) The mechanism of cleavage in animal cells. *Biol. Rev.*, 33:103.
- Wolper, L.: (1960) The mechanics and mechanism of cleavage. *Int. Rev. Cytol.*, 10:163.
- the mitotic spindle in living cells with an improved polarization microscope*. Thesis, Princeton University.
7. Inoué, S.: (1953) *Chromosoma*, 5:487.
8. Inoué, S. and Sato, H.: (1967) *J. gen. Physiol.*, 50:259.
9. Nicklas, R. B.: (1967) *Chromosoma*, 21:1.
10. Gross, P. R. and Spindel, W.: (1960) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 84:745.
11. Marsland, D. and Zimmerman, A. M.: (1965) *Exp. Cell Res.*, 38:306.
12. Harris, P.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 11:419.
13. Moor, H.: (1967) *Protoplasma*, 64:89.
14. Kiefer, B., Sakai, H., Solari, A. and Mazia, D.: (1966) *J. molec. Biol.*, 20:75.
15. Barnicot, N. A.: (1966) *J. Cell Sci.*, 1:217.
16. Mazia, D.: (1955) *Symp. Soc. exp. Biol.*, 9:335.
17. Rebhum, Z. I. and Sander, G.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:859.
18. Kane, R. E.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25:137.
19. Kane, R. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:243.
20. Stephens, R. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:255.
21. Sakai, H.: (1966) *Biochim. biophys. Acta*, 112: 132.
22. Mazia, D.: (1961) *Scient. Amer.*, 205:100.
23. Kawamura, N. and Dan, K.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:615.
24. Brinkley, B. R., Stubbfield, E. and Hsu, T. C.: (1967) *J. Ultrastruct. Res.*, 19:1.
25. Roth, L. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:47.
26. Ris, H.: (1949) *Biol. Bull.*, 96:90.
27. Hughes, A. F. and Swann, M. M.: (1948) *J. exp. Biol.*, 25:45.
28. Hoffmann-Berling, H.: (1954) *Biochim. biophys. Acta*, 15:226, 332.
29. Mazia, D.: (1961) Mitosis and the cell physiology of cell division. In: *The cell*, vol. 3, p. 77. (Brachet, J. and Mirsky, A. A., eds.) Academic Press, New York.
30. Taylor, E. W.: (1959) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6:193.
31. Harris, P.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25 (Suppl.): 73.
32. Nicklas, R. B.: (1967) *Chromosoma*, 21:17.
33. Sato, S.: (1960) *Cytologia*, 25:119.
34. Forer, A.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25 (Suppl.):95.
35. Bajaj, A.: (1967) *J. Cell Biol.*, 33:713.
36. Hiramoto, Y.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25 (Suppl.): 161.
37. Dan, K.: (1963) Force of cleavage of the dividing sea urchin egg. In: *Cell growth and cell division. Symposia of the International Society for Cell Biology*, vol. 2, p. 261. Academic Press, New York.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Swann, M. M. and Mitchison, J. M.: (1958) *Biol. Rev.*, 33:103.
- Cleveland, L. R.: (1953) *Trans. amer. Phil. Soc.*, new series, 43:809.
- Bernhard W. et Mitchison, J. M.: (1958) L'ultrastructure du centriole et d'autres éléments du l'appareil achromatique. *Proc. 4th Internat. Conf. Electron Microsc.*, 2:217.
- Mazia, D., Harris, P. J. and Bibring, T.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:1.
- Mazia, D. and Dan, K.: (1952) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 38:826.
- Inoué, S.: (1951) *Studies of the structure of*
- Swann, M. M.: (1952) *Int. Rev. Cytol.*, 1:195.
- Fautrez, J.: (1963) In: *Cell growth and cell division. Symposia of the International Society for Cell Biology*, vol. 2, p. 199. (Harris, R. J. C. ed.) Academic Press, New York.
- Hoffmann-Berling, H.: (1964) *Biochim. biophys. Acta*, 14:182; 15:226.
- Hoffmann-Berling, H.: (1956) *Biochim. biophys. Acta*, 19:453.
- Oknishi, T.: (1962) *J. Biochem.*, 52:145.
- Sakai, H.: (1965) *Biochim. biophys. Acta*, 102: 235.

Bases cromosómicas de la genética

La Citogenética, que ha surgido de la convergencia de la Citología con la Genética, estudia las bases citológicas y moleculares de la herencia, variación, mutación, filogenia, morfogénesis y evolución de los organismos. También trata de importantes problemas aplicables a la Medicina y la Agricultura.

En este capítulo abordaremos los aspectos citogenéticos de la herencia, mutación y evolución. La determinación del sexo y la citogenética humana se estudiarán en el capítulo 15, y la interpretación de los fenómenos genéticos al nivel molecular, en el capítulo 19.

LEYES DE LA HERENCIA

Gregorio Juan Mendel, al estudiar los cruzamientos de las arvejas (*Pisum sativum*), descubrió en 1865 las leyes que rigen la transmisión hereditaria en el mundo biológico.

Mendel seleccionó diversas variedades de arvejas con características diferentes o *contrastantes*, que se mantenían invariables en los cruzamientos. Por ejemplo, utilizó plantas de flores blancas y rojas, con semillas lisas y rugosas, o amarillas y verdes, de tallos alto y bajo, etc. Después de haber realizado los cruzamientos, observó los *híbridos* resultantes en la primera generación, F_1 ("filial"). Después cruzó los híbridos (F_1) entre sí y estudió el resultado en la segunda generación "filial" F_2 . En un cruzamiento realizado entre progenitores (P) con semillas amarillas y verdes, encontró, en la primera generación, que todos los híbridos tenían semillas amarillas y, por tanto, sólo la característica de uno de los padres. En el segundo cruzamiento (F_2), las plantas que se obtuvieron presentaban las características de sus antepasados repetidas en la proporción de 75 y 25 por ciento, o sea 3:1.

Principio o ley de la segregación

Genotipo y fenotipo

Mendel sostuvo que el color de las semillas era controlado por un "factor" que se transmitía a la descendencia por medio de los gametos. Este "factor", conocido como *gene*, podía transmitirse sin mezclarse con otros genes. Al mismo tiempo enunció que el gene era susceptible de *segregarse* en el híbrido para entrar en gametos diferentes y *distribuirse* en la descendencia de los híbridos. Por esa razón, ésta se denomina *ley o principio de la segregación de los genes*. Posteriormente observó que las plantas con semillas amarillas en la F_2 poseían diferentes constituciones genéticas. Un tercio de este grupo siempre daba semillas amarillas, pero los otros dos tercios de la generación F_3 originaban plantas con semillas amarillas y verdes en la proporción 3:1. El 25 por ciento de plantas (en la F_2) con semillas verdes, cuando se cruzaban entre sí, producían siempre semillas verdes. Ello demuestra que éstas eran líneas puras para ese carácter. Si representamos por medio de letras los genes en los cruzamientos, designando con A al gene para el carácter amarillo y con a al gene para el carácter verde, tenemos lo siguiente:

P	AA	X	aa
F_1		Aa	
F_2	AA	Aa aA	aa
	homocigótico dominante	heterocigótico	homocigótico recesivo
	1	2	1
		fenotipo amarillo	fenotipo verde
		3	1

En la primera generación (F_1) se hallan presentes ambos genes, A y a, pero sólo el A produce el carácter visible (amarillo) porque

es *dominante*; el gene *a* permanece oculto y se denomina *recesivo*. En el híbrido F_1 , los dos genes se segregan y entran en gametos diferentes. La mitad de ellos llevará el gene

A y la otra mitad el gene *a*. Como cada individuo produce dos tipos de gametos en cada sexo, existen cuatro combinaciones posibles en la F_2 . Esto da como resultado la relación

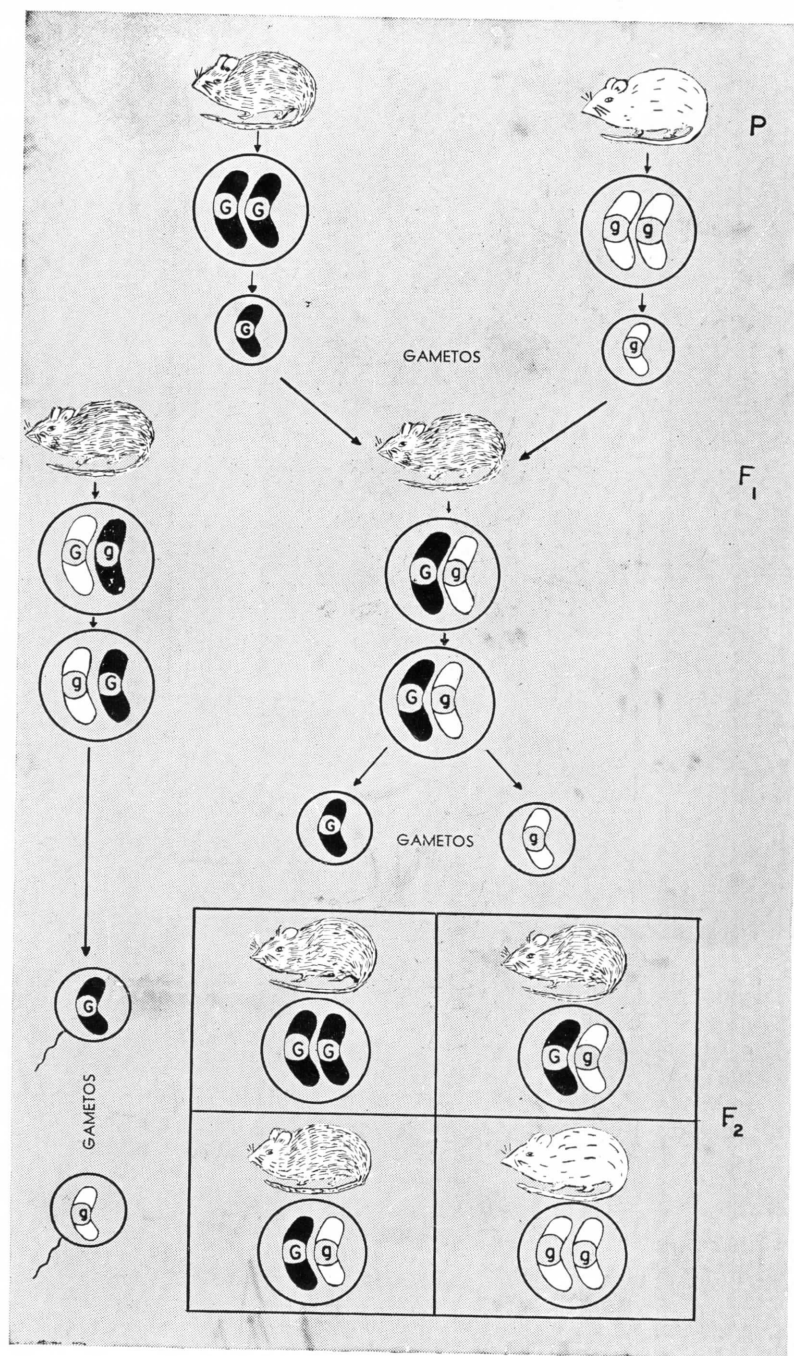


FIG. 14-1. Cruza monohíbrida entre un ratón gris (dominante) y uno blanco (recesivo). Se indica el paralelismo entre la distribución de los genes y cromosomas, lo mismo que los genotipos resultantes en las generaciones F_1 y F_2 .

1:2:1, correspondiendo el 25 por ciento a plantas (AA) con semillas amarillas puras, 50 por ciento con semillas amarillas híbridas (Aa) y 25 por ciento con semillas verdes puras (aa).

Mendel confirmó que los híbridos F_1 producían dos clases de gametos en números iguales. Realizando el retrocruzamiento de los híbridos de la F_1 (el heterocigótico Aa) con el homocigótico recesivo aa, obtuvo una relación de 1 Aa : 1 aa. Se han empleado pruebas similares de cruzamiento para saber si un organismo dominante de antepasados desconocidos es homocigótico o heterocigótico.

Ahora es posible explicar los resultados de Mendel en términos del comportamiento de los cromosomas y de los genes. Como se ve en la figura 14-1, en la cual se indica sólo un par de cromosomas y los genes que intervienen, podemos marcar el gene para el gris (G) y el gene para el blanco (g).

Los genes presentes en los cromosomas se encuentran de a pares, denominados pares de *alelos*. En cada cromosoma homólogo existe un gene en un lugar particular, el *locus* (plural *loci*). En el caso ilustrado en la figura 14-1 el ratón tendrá dos genes, uno en cada homólogo. Puesto que los dos homólogos se separan en la meiosis, los dos genes GG deben separarse también para entrar en los gametos.

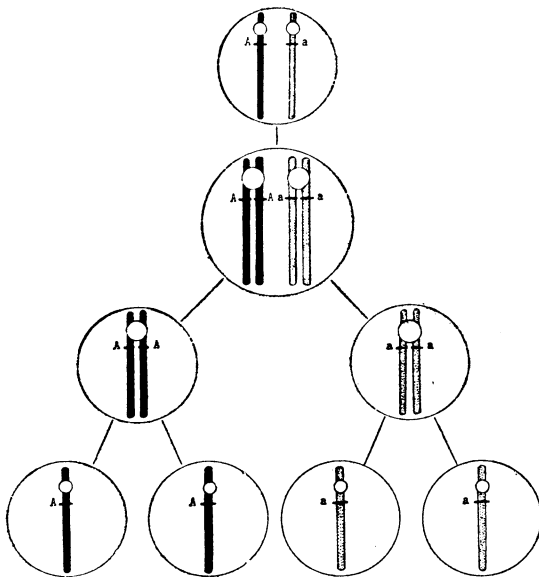


FIG. 14-2. Esquema sobre la segregación de una pareja de genes localizada en una pareja de cromosomas sin que se haya efectuado *crossing-over* durante la meiosis, resultando dos clases de gametos.

El mecanismo es similar tanto para un dominante como para un recesivo. En el híbrido F_1 , un cromosoma lleva el gene G y el cromosoma homólogo el gene g.

Cuando los híbridos se autofecundan, los gametos se unen en las combinaciones ilustradas por el método del damero (fig. 14-1). En la figura 14-2 se incluye un esquema de la segregación de un par de genes contenidos en un par de cromosomas que no tienen *crossing-over*.

En este momento es importante introducir los conceptos de *genotipo* y *fenotipo*. Johansen propuso, en 1911, el término de *genotipo* para la constitución genética en la cual todos los genes están representados, y el de *fenotipo* para las características visibles que presenta un individuo. Por ejemplo, en el caso mencionado en primer término existen dos fenotipos en la F_2 : semillas amarillas y semillas verdes en la proporción de 3:1, respectivamente. Sin embargo, de acuerdo con la constitución genética hay tres genotipos diferentes, 1 AA, 2 Aa y 1 aa. Esto significa que existen dos proporciones mendelianas, la fenotípica (3:1) y la genotípica (1:2:1). El concepto de genotipo se debe extender a todas las características del individuo, que constituyen una expresión de los genes. Estos no son solamente externos o visibles, sino también internos y latentes. Así, en el ser humano, las diferentes hemoglobinas o los grupos sanguíneos, o bien algunas diferencias en gusto hacia la tiourea, son características fenotípicas.

Si se cruzan ciertas plantas que tienen flores rojas y blancas, como la *Mirabilis jalapa*, es posible encontrar en la F_2 tres fenotipos (flores rojas, rosadas y blancas) que corresponden a los tres genotipos. Esto se debe al hecho de que la dominancia es incompleta. No siempre se cumple la regla de la dominancia y de la recesividad; la dominancia es completa en la mayoría de los casos pero incompleta en otros, existiendo un fenotipo de características mezcladas, sin que se mezclen los genes alelos. A ello se denomina *herencia intermedia*.

Principio o ley de la recombinación independiente

Mientras la ley de segregación se aplica al comportamiento de un solo par de genes, el principio de la recombinación independiente describe el comportamiento simultáneo de dos

o más pares de genes localizados en diferentes pares de cromosomas. Los genes que están en cromosomas separados se distribuyen independientemente durante la mitosis. La descendencia resultante es híbrida en dos *loci* (también denominado un dihíbrido).

La figura 14-3 evidencia el cruzamiento entre un cobayo oscuro, con pelo corto (*BBSS*), y otro castaño, con pelo largo (*bbss*). El individuo *BBSS* produce todos los gametos del tipo *BS* y el cobayo *bbss* solamente gametos de tipo *bs*. En la generación F_1 , la descen-

dencia es heterocigótica para el color y la longitud del pelo. Fenotípicamente, todos son oscuros y de pelo corto.

Cuando dos de los dihíbridos de la F_1 se aparean, cada uno produce cuatro tipos de gametos (*BS*, *Bs*, *bS*, *bs*), que por medio de la fecundación originan 16 combinaciones cigóticas. Nueve individuos de la F_2 son de pelo oscuro y corto, tres de pelo oscuro y largo, tres de pelo castaño y corto, y solamente un individuo de pelo castaño y largo. Esta relación fenotípica de 9:3:3:1 es caracterís-

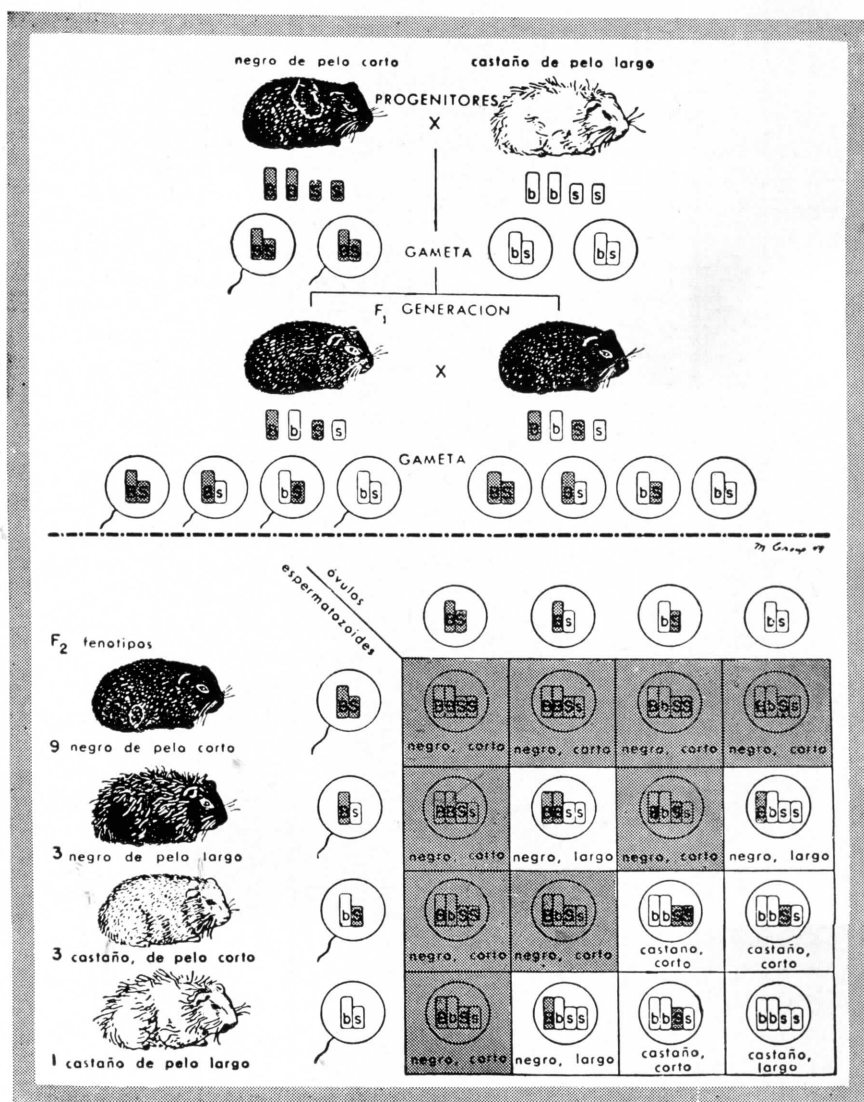


FIG. 14-3. Esquema del cruzamiento entre un cobayo de pelo negro y corto (dominante) y otro de pelo castaño y largo (recesivo). Es evidente la segregación independiente de los genes. (Véase la descripción en el texto.) (De Villee.)

tica del cruzamiento de dos pares de genes que contrastan.

La separación independiente de dos o más pares de cromosomas homólogos se puede descubrir citológicamente sólo si los dos homólogos difieren desde el punto de vista morfológico.

LIGAMIENTO Y CROSSING-OVER

Los estudios de Morgan y colaboradores, entre 1910 y 1915, con la mosca *Drosophila melanogaster* demostraron que las leyes de la recombinación independiente no se aplican de manera universal, y que en algunos cruzamientos de dos o más pares de genes alelos existía cierta limitación en la libre segregación. En cada caso, había una tendencia acentuada a que las combinaciones quedaran ligadas, produciéndose una proporción menor de nuevas combinaciones.

Si dos genes *A* y *B*, o *a* y *b*, están en el mismo cromosoma, se pueden obtener sólo dos clases de gametos:

$$\begin{array}{l} \text{ABab} \times \text{abab} \\ 1 \text{ ABab} : 1 \text{ abab} \end{array}$$

La figura 14-4 ilustra el mecanismo de la meiosis y la formación de los gametos en este híbrido que posee los dos genes dentro del mismo cromosoma. La coexistencia de dos o más genes en el mismo cromosoma se denomina *ligamiento* (*linkage*).

Después de haber estudiado un número considerable de diferentes cruzamientos en la *Drosophila*, Morgan llegó a la conclusión de que todos los genes de la mosca estaban comprendidos en cuatro grupos ligados, cada uno de los cuales se hallaba en un solo cromosoma. En la *Drosophila* existen cuatro pares de cromosomas, cada uno con un grupo de genes. El primer cromosoma tiene varios cientos de genes; el cuarto cromosoma, que es el más pequeño, sólo posee unos pocos. Estudios adicionales demostraron que el "ligamiento" de los factores no es absoluto y puede romperse con cierta frecuencia. Por ejemplo, si una hembra híbrida con los genes "gris y alas largas" (doble dominante) es cruzada con un macho con los genes "oscuros y alas vestigiales" (doble recesivo), tenemos un resultado inesperado, puesto que en lugar de dos clases de descendientes se obtienen cuatro. Las dos primeras combinaciones son las esperadas y aparecen en el 83 por ciento de los casos; las otras son combinaciones nuevas ("gris, alas vestigiales" y "negro, alas largas") y se presentan en el 17 por ciento de los casos. En la figura 14-5, los genes dominantes están marcados ++ y los recesivos *bv*.

Morgan conjeturó que ese 17 por ciento de moscas es el producto de la ruptura del "ligamiento", y que la recombinación o formación de nuevas combinaciones debe provenir de un intercambio de segmentos entre los dos cromosomas homólogos del híbrido. Este fe-

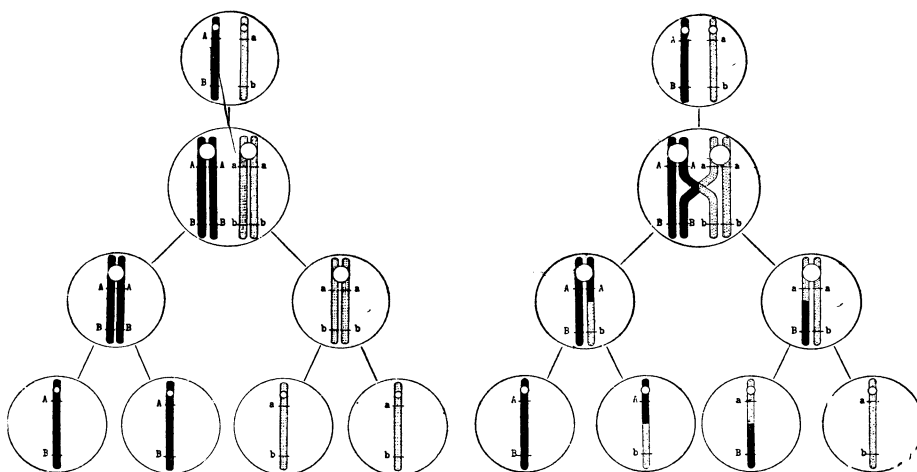


FIG. 14-4. *Izquierda.* Esquema de la segregación de dos pares de genes alelomorfos localizados en un mismo par de cromosomas sin que haya ocurrido *crossing-over* en la meiosis, lo que da por resultado dos clases de gametos, *AB* y *ab*. Caso de "ligamiento". *Derecha.* Esquema de la segregación de dos pares de genes localizados en el mismo par de cromosomas en los cuales se ha efectuado *crossing-over* durante la meiosis, resultando cuatro clases diferentes de gametos, *AB*, *Ab*, *aB* y *ab*: caso de "ligamiento" con *crossing-over*.

Para determinar cuál es la correcta, debe investigarse el porcentaje de *crossing-over* entre A y C. Si es del 7 por ciento, la secuencia (1) será la verdadera. Esta experiencia, denominada “de tres puntos” por Sturtevant, se usa comúnmente para construir mapas genéticos.

Los mapas genéticos representan el orden relativo de los genes a lo largo del cromosoma; sin embargo, la frecuencia del cruzamiento varía en diferentes puntos de cromosoma y en distintos organismos. El concepto de distribución lineal de los genes con una localización específica se ajusta muy bien a nuestro conocimiento de la estructura de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) y su función en los fenómenos genéticos. Para una interpretación del *crossing-over* a nivel molecular, véase *Duplicación del ADN en la meiosis* (cap. 17).

Índice de recombinación

La estimación del número posible de nuevas recombinaciones puede obtenerse mediante el recuento de quiasmas meióticos. El denominado *índice de recombinación* se logra sumando al número de bivalentes el número de quiasmas registrados en la misma célula en el estado de diplonema. En las especies con índice más alto, la posibilidad de nuevas recombinaciones es mayor, lo cual implica más posibilidades de variación.

Dos ejemplos se mencionan a continuación:

	Número diploide	Número bivalente	Quiasmas por célula	Índice de recombi- nación
<i>Schistocerca cancellata</i> (langosta)	23	12	17	28
<i>Zea mays</i> (maíz)	20	10	27	37

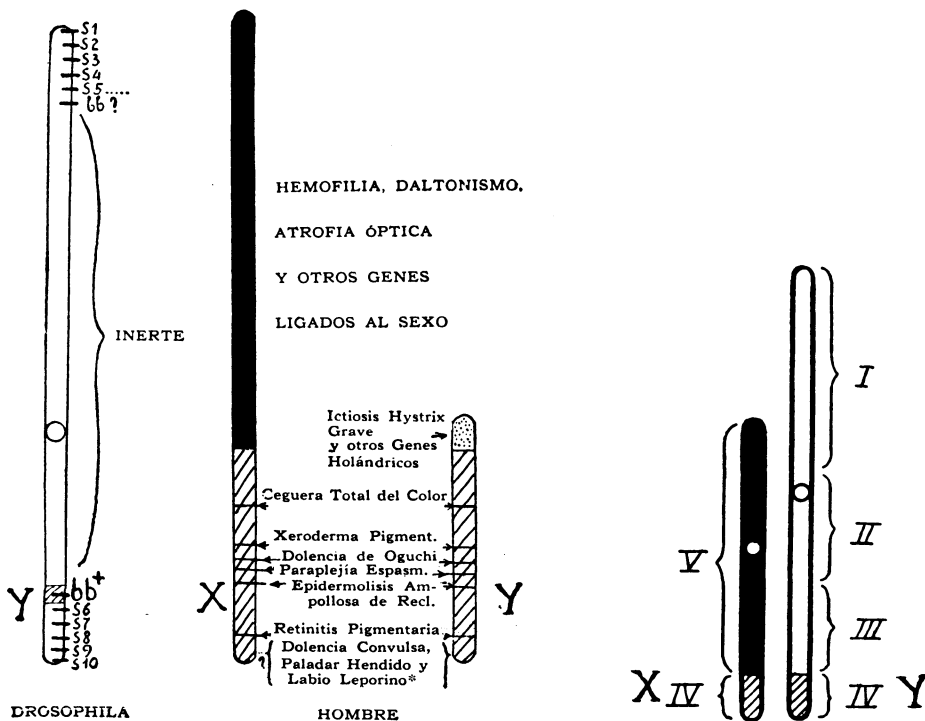


FIG. 14-6. Izquierda. Representación esquemática de los cromosomas sexuales de *Drosophila melanogaster*, del hombre y de *Melandrium*, con las regiones diferenciales y homólogas (estas últimas en rayas diagonales) y la posición de los genes. En el cromosoma Y de *Drosophila* hay una extensa región inerte, los genes alelomorfos de la célula “bobbed” (*bb*) en el segmento homólogo y los complejos de genes de fertilidad del macho en el segmento diferencial. (Tomado de Serra, 1949, según los datos de Nuhaus, Snyder y Palmer y de Westergaad.) Derecha. Cromosomas sexuales en *Melandrium*: I, II y III, segmento diferencial de Y; IV, segmentos homólogos; V, segmento diferencial de X. (Westergaad, 1958.)

Crossing-over y recombinación en la Neurospora

Entre los diferentes organismos estudiados en Genética, el hongo *Neurospora* ocupa un lugar muy especial. La ventaja de este organismo es doble: a) se puede identificar y seguir el destino de cada una de las cuatro cromátidas presentes en los cromosomas

meióticos bivalentes y por tanto determinar si el *crossing-over* comprende 2, 3 ó 4 cromátidas; b) es posible establecer una íntima correlación entre la constitución genética y la expresión bioquímica de los genes.

Como se ve en la figura 14-7, las cuatro células resultantes de las dos divisiones meióticas experimentan una división mitótica que da lugar a ocho

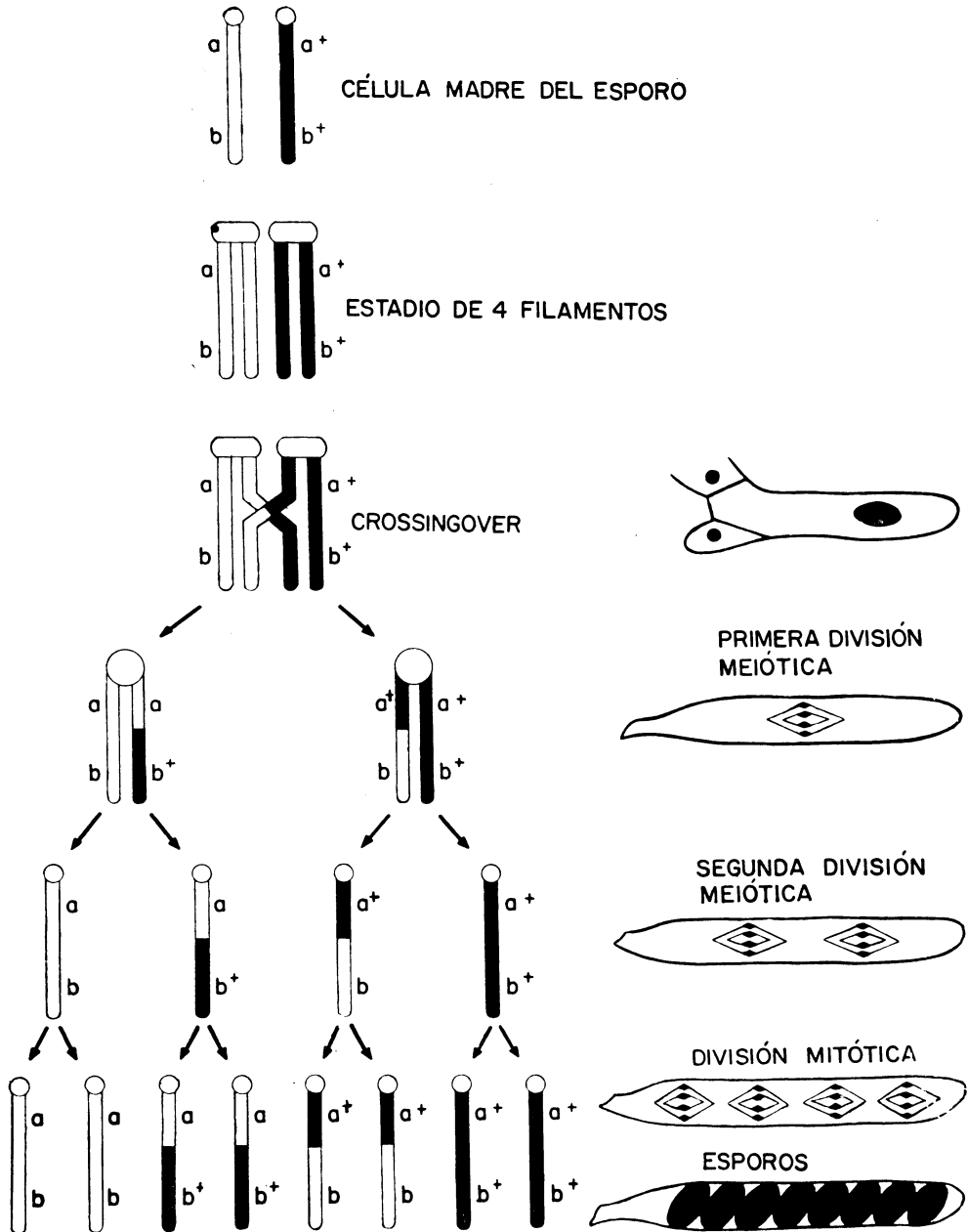


FIG. 14-7. Esquema de la formación de los ascosporos en *Neurospora crassa*. Se muestra un *crossing-over* simple entre los genes *a* y *b*, el comportamiento de un par de cromosomas durante las divisiones meióticas I y II, y la división mitótica posterior de cada uno de los cuatro elementos.

ascosporas. Cada una de ellas puede aislarse por disección y cultivarse separadamente, obteniéndose individuos haploides que presentan la constitución genética transportada en cada una de las cuatro cromátidas provenientes del cromosoma bivalente.

En la figura se indica un *crossing-over* entre los genes *a* y *b* y los productos resultantes. El análisis de las ocho ascosporas demuestra que sólo dos de las cromátidas intercambian segmentos, mientras que las otras dos permanecen intactas. También se observa que la segregación de los genes puede realizarse indistintamente en la primera o en la segunda división meiótica, dependiendo ello de la posición del *locus* en cuestión respecto del punto de *crossing-over* y del centrómero. Por tanto, en la figura 14-7, los genes *aa+* se separan en la primera división meiótica, y los genes *bb+* en la segunda división meiótica.

ALTERACIÓN DE LOS CROMOSOMAS Y MECANISMO DE SU ORGANIZACIÓN

El funcionamiento normal del sistema genético de un organismo se mantiene en alineamiento y distribución por la constancia del material hereditario que se halla en los cromosomas. En ocasiones, éstos presentan cambios espontáneos o producidos por accidentes experimentales que dan lugar a desarreglos en la estructura. Los conocimientos de estos cambios fueron favorecidos por métodos que aumentaron su frecuencia y suministraron medios valiosos para el análisis de la organización genética y estructural del cromosoma y del mecanismo de la mutación y evolución de los organismos.

En el cromosoma, los cambios estructurales pueden ser: 1) *submicroscópicos*, al nivel molecular, por ejemplo, *mutación de punto* o *génica*; 2) *microscópicos* o *aberraciones*, evidenciadas con el microscopio óptico.

Las aberraciones comprenden:

a) Pérdida del segmento de un cromosoma: *deficiencia* o *delección*.

b) Adición de un segmento cromosómico: *duplicación*.

c) Reordenamiento intercromosómico por intercambio de segmentos entre cromosomas no homólogos: *traslocación*.

d) Reordenamiento intracromosómico por rotación de un segmento, invirtiendo el orden de los genes en el cromosoma: *inversión*.

Mutación

Aunque el gene es generalmente estable, puede experimentar un cambio que se denomina *mutación*. Esta constituye una propiedad del material genético tan importante co-

mo la estabilidad. Tiene lugar en todos los seres vivos y es el origen de las variaciones hereditarias. El cambio o mutación de un gene ocurre espontáneamente, sin causa aparente, y es luego incorporada a la especie y transmitida por reproducción sexual. Solamente será eliminada si el individuo desaparece o no puede reproducirse. Las mutaciones génicas son cambios localizados en puntos definidos de los cromosomas y probablemente en genes individuales. La mutación se produce en organismos unicelulares y también en tejidos somáticos. La frecuencia de mutación es diferente para cada gene; existen alelos muy estables y otros que pueden mutar con gran frecuencia. Por ejemplo, el alelo normal del gene recesivo para la hemofilia en el hombre cambia una vez cada 31,000 individuos en cada generación.

Actualmente es posible inducir mutaciones por medio de las radiaciones ionizantes y no ionizantes, sustancias químicas y acción de la temperatura (véase más adelante). La producción experimental de mutaciones puede aumentar su frecuencia, pero no se observan diferencias entre las aberraciones inducidas artificialmente y las que aparecen de modo espontáneo. La proporción de mutaciones espontáneas es generalmente baja. En cada generación de *Drosophila melanogaster* existen de 1:100,000 a 1:1,000,000 de mutaciones. Los organismos unicelulares son los más adecuados, en la práctica, para estudiar la frecuencia de mutación debido a la gran cantidad de generaciones que pueden producir. En la tabla 14-1 se representa la frecuencia de mutación para algunos genes. En el capítulo 19 se estudiarán las bases moleculares de la mutación.

TABLA 14-1. Frecuencia de mutaciones espontáneas en algunos genes

Organismos	Gene	Número de gametos verificado	Frecuencia de mutación por cada 10,000 gametos
Maíz	wx	1,503,744	0
	i	265,391	1.06
	rr	43,416	18.2
<i>Drosophila</i>	Ojo blanco	70,000	0.29
<i>melanogaster</i>	Vestigial	60,000	0.3
	Hemofilia		0.32
Hombre	Condrodistrofia		0.427
	Retinoblastoma		0.23

Según Wagner y Mitchell, 1951

Deficiencia o delección

La deficiencia es una aberración cromosómica en la que un segmento —sea *intersticial* o *terminal*— se halla ausente (fig. 14-8). El

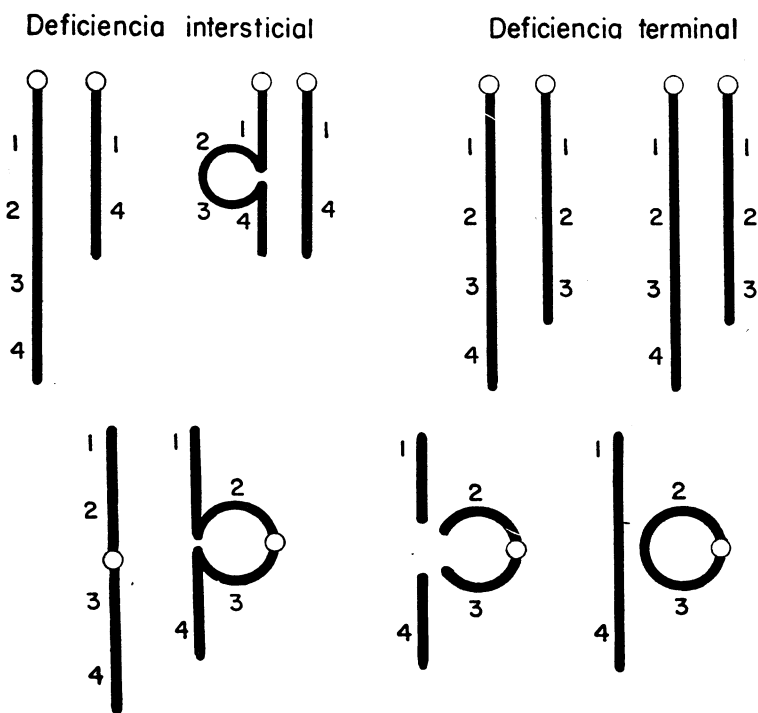
segmento deficiente no puede sobrevivir si carece de centrómero. En el caso de un centrómero difuso, el segmento deficiente sobrevive y es susceptible de incorporarse como un nuevo cromosoma. La deficiencia terminal resulta de la fractura en un cromosoma; la deficiencia intersticial se produce por dos fracturas, seguidas de la reunión de los extremos fracturados. Ambos tipos pueden observarse durante el estadio del paquinema de la meiosis o en el cromosoma politénico. Se han descrito deficiencias terminales en el maíz, pero son raras en la *Drosophila* y en otros organismos. En una deficiencia heterocigótica, uno de los cromosomas es normal, mientras que el homólogo lleva la deficiencia (figura 14-8).

Los animales con deficiencia homocigótica generalmente no llegan al estado adulto en virtud de que les falta un juego completo de genes. Este hecho sugiere que muchos de esos genes son indispensables, por lo menos en dosis simples, para el desarrollo de un organismo viable.¹ Las deficiencias son muy

útiles en el sentido de que permiten establecer la localización de un gene, así como también revelar la presencia y posición de los genes que carecen de pareja.

Duplicación

La *duplicación* tiene lugar cuando un fragmento del cromosoma está representado dos o más veces en él. Puede ser un fragmento libre con un centrómero o un segmento cromosómico del complemento normal. Si el fragmento incluye al centrómero, será incorporado como un cromosoma pequeño (cromosoma extra; fig. 14-9). Cuando la duplicación ocurre en un segmento agregado, la disposición puede ser en tándem. Un ejemplo de duplicación en tándem es el caso bien conocido de *Bar* en la *Drosophila*. Las duplicaciones permiten investigar los efectos de un complemento extra de genes en los correspondientes *loci*. En general, las duplicaciones son menos deletéreas para el individuo que las deficiencias.



Formación de un segmento acéntrico y un anillo

FIG. 14-8. Esquema que ilustra el origen de una deficiencia intersticial (a la izquierda, arriba) y de una terminal (a la derecha, arriba). Abajo se aprecia el mecanismo que origina un cromosoma deficiente anular con centrómero y un fragmento acéntrico (sin centrómero) que se pierde.

Traslocaciones

Traslocación es un reordenamiento cromosómico por el cual se intercambian porciones entre cromosomas no homólogos, o bien se trasfiere una porción de un cromosoma a una parte distinta de éste o a otro cromosoma. La primera es una traslocación recíproca, la segunda una traslocación simple. Cuando un segmento intersticial pasa del brazo de un cromosoma a una posición diferente del mismo cromosoma, o a otro cromosoma, el reordenamiento se denomina *transferencia* o *shift*. Esta requiere la producción de tres fracturas simultáneas. Las traslocaciones recíprocas pueden ser homocigóticas o heterocigóticas (figura 14-10).

No es posible distinguir citológicamente una traslocación homocigótica de una pareja de cromosomas normales, pero ésta puede ser descubierta por experimentos genéticos. Las traslocaciones heterocigóticas ocasionan configuraciones especiales de apareamiento en la meiosis.

En vegetales, los individuos heterocigóticos para las traslocaciones serán la mitad estériles. El examen citológico del polen de maíz revelará que alrededor de la mitad de los granos de polen están vacíos, con poco o nada de almidón, y son estériles.

Se produce un resultado interesante cuando, al

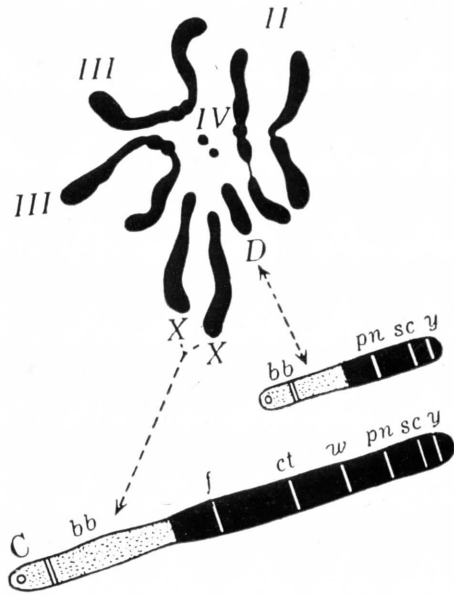


FIG. 14-9. Duplicación de un segmento del cromosoma X en *Drosophila melanogaster*. El elemento duplicado (b) contiene su propio centrómero y por lo tanto aparece como un cromosoma separado. En negro se indican las regiones eucromáticas y en puntos las heterocromáticas. (Según Simmott, Dunn y Dobzhansky, 1958.)

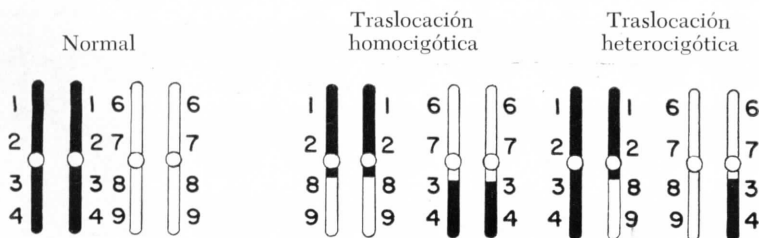


FIG. 14-10. Representación esquemática de una traslocación recíproca homocigótica y heterocigótica, en comparación con las disposiciones habituales.

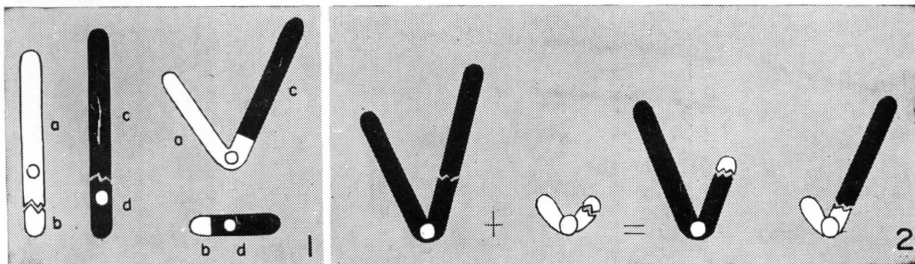


FIG. 14-11. Origen de un nuevo cromosoma con forma de V (metacéntrico) por *fusión céntrica* a partir de dos segmentos cromosómicos acrocéntricos homólogos. El trozo bd se pierde. 2 *Disociación*: un cromosoma metacéntrico y un pequeño fragmento supernumerario experimentan una traslocación, que conduce a la formación de dos cromosomas (uno acrocéntrico y otro metacéntrico.)

traslocarse, ambos cromosomas se fracturan muy cerca de sus centrómeros. La fusión crea un cromosoma metacéntrico con dos brazos en forma de V y un pequeño fragmento que tiende a ser eliminado. La figura 14-11, 1 ilustra el mecanismo de *fusión céntrica*. Este proceso ha tenido lugar durante la filogenia de la *Drosophila*, en ortópteros, reptiles, aves, mamíferos y otros grupos. De este modo se establece un nuevo tipo de cromosoma y se reduce el número somático de cromosomas en la especie. Inversamente a la fusión céntrica, puede ocurrir un cambio llamado *disociación* a partir de un cromosoma metacéntrico y un fragmento cromosómico pequeño, que por traslocación origina dos nuevos cromosomas en una especie (fig. 14-11, 2).

Inversión

La *inversión* es una aberración cromosómica en la cual un segmento se invierte 180° respecto de su ordenamiento normal. Las inversiones se denominan *pericéntricas* cuando incluyen al centrómero y *paracéntricas* si éste se halla ubicado fuera del segmento invertido. Cuando tiene lugar el *crossing-over* (quiasma) dentro del segmento invertido en una inversión paracéntrica, se forma una cromátida dicéntrica y otra acéntrica (fig. 14-12). La primera constituye un puente que se rompe

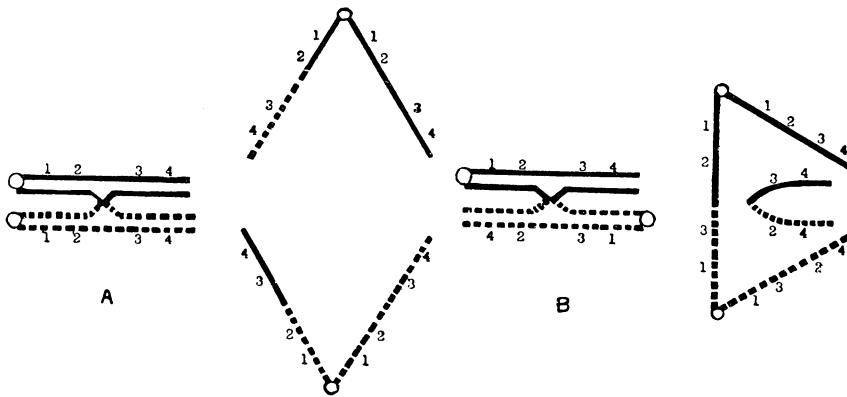


FIG. 14-12. Esquema que muestra, en A, el *crossing-over* normal entre dos cromátidas y su resultado en el momento de la anafase; y en B, el *crossing-over* entre dos cromátidas, una normal y otra invertida (4 2 3 1). Durante la anafase se produce un fragmento (3 4 2 4) sin centrómero y un puente dicéntrico anafásico (1 2 3 1) con dos centrómeros. El fragmento se pierde.

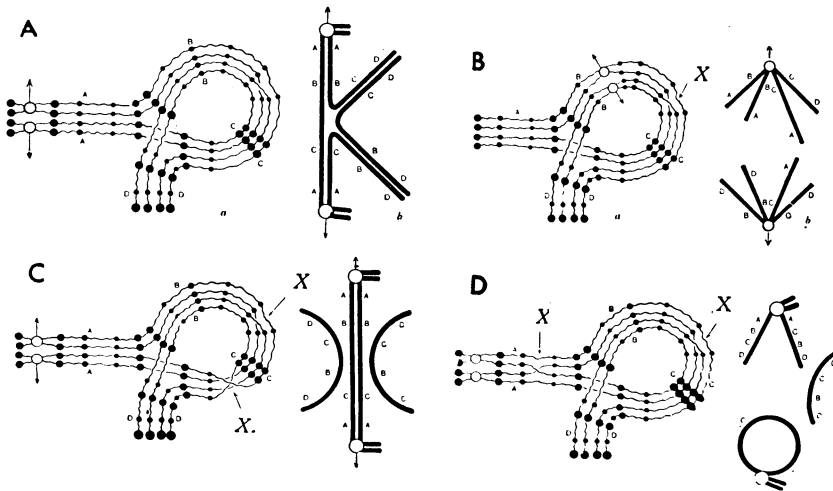


FIG. 14-13. A Consecuencia del *crossing-over* en una inversión paracéntrica. B Cuando se forma un quiasma dentro de una inversión pericéntrica, los resultados serán duplicaciones y deficiencias. C Dos quiasmas complementarios en los límites de una inversión y sus consecuencias. D Modo como se produce un anillo en las cromátidas cuando un quiasma se forma entre el centrómero y el segmento invertido y el otro se halla dentro de la inversión. (según White, 1945).

cuando los cromosomas anafásicos divergen hacia los polos.

La presencia de este puente o fragmento de cromátida suministra un método citológico para descubrir inversiones durante la división meiótica. Cuando tiene lugar el *crossing-over* dentro del asa de una inversión pericéntrica, aparecen cromátidas con deficiencias y duplicaciones (fig. 14-13, *B*). Cromátidas con una asa pueden formarse durante la primera anafase cuando los quiasmas se producen entre las regiones invertidas y el centrómero, lo mismo que dentro de la inversión. En este caso, es susceptible de que se constituya un puente dicéntrico en la segunda anafase (fig. 14-13, *D*).

Se han suscitado cambios de este tipo en la evolución de algunas especies de *Drosophila* y en ciertos géneros de ortópteros.

Isocromosomas. Un nuevo tipo de cromosoma puede originarse por ruptura (división fallida) del cen-

trómero. Como lo demuestra la figura 14-14, los dos cromosomas telocéntricos resultantes se pueden abrir, produciendo dos brazos idénticos (isocromosomas). Este tipo de cromosomas se ha obtenido en material irradiado. En la meiosis, los isocromosomas pueden aparearse entre sí o con homólogos normales.

VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE CROMOSOMAS

Los cambios en el número de cromosomas dan lugar: 1) a organismos *euploides*, en los cuales existe un juego haploide completo de cromosomas, y 2) a organismos *aneuploides*, en los que se ha producido la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas en el juego y tienen, por tanto, un número incompleto de ellos (tabla 14-2).

TABLA 14-2. Complementos cromosómicos en euploides y aneuploides

<i>T i p o</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Complemento</i>
EUPLOIDES		
Monoploide	n	(ABCD)
Diploide	$2n$	(ABCD) (ABCD)
Triploide	$3n$	(ABCD) (ABCD) (ABCD)
Tetraploide	$4n$	(ABCD) (ABCD) (ABCD) (ABCD)
Autotetraploide	$4n$	(ABCD) (ABCD) (ABCD) (ABCD)
Alotetraploide	$4n$	(ABCD) (ABCD) (A'B'C'D') (A'B'C'D')
ANEUPLOIDES		
Monosómico	$2n - 2$	(ABCD) (ABC)
Trisómico	$2n + 1$	(ABCD) (ABCD) (B)
Tetrasómico	$2n + 2$	(ABCD) (ABCD) (B) (B)
Doble trisómico	$2n + 1 + 1$	(ABCD) (ABCD) (AC)
Nulisómico	$2n - 2$	(ABC) (ABC)

A, B, C y D son cromosomas no homólogos.

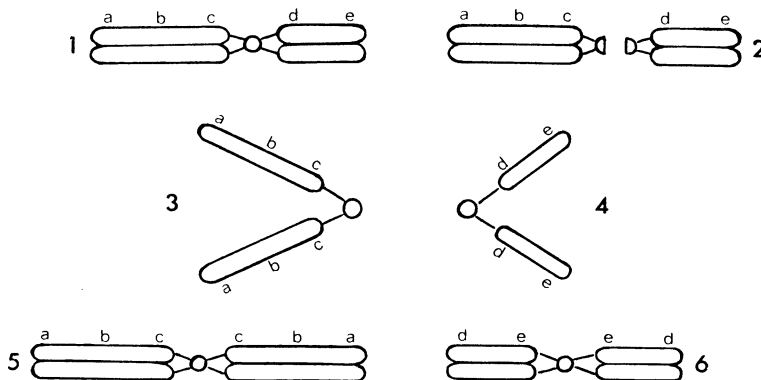


FIG. 14-14. Esquema que evidencia la formación de isocromosomas. 1, Cromosoma original; 2, ruptura a nivel del centrómero, en el comienzo de la anafase mitótica; 3, las cromátidas se separan en dos isocromosomas; 4, en la división siguiente se encuentran dos isocromosomas completos. Obsérvese que cada brazo tiene la misma constitución genética.

Haploidía

Ciertos vegetales y animales poseen un conjunto *monoploide* de cromosomas con un solo *genomio*. Estos organismos tienen una meiosis muy irregular debido a la ausencia de cromosomas homólogos para aparearse. Como resultado, se pueden producir gametos con un número variable de cromosomas. Se encuentran individuos haploides en *Sorghum*, *Triticum*, *Hordeum*, *Datura*, etcétera. En los animales, un sexo puede ser haploide normalmente, como sucede con los machos de los himenópteros.¹

Poliploidía

Los vegetales o animales que presentan más de dos juegos haploides de cromosomas se denominan *poliploides* (fig. 14-15). Este tipo de cambio es común en la naturaleza, especialmente en las plantas fanerógamas. Por ejemplo, en el *Sorghum*, donde el número básico es $n = 5$, *S. versicolor*, *S. sudanensis* y *S. halepense* poseen, respectivamente, 10, 20 y 40 cromosomas somáticos. Dichas especies constituyen una serie en la que las dos últimas son poliploides.

En los organismos diploides existen dos genomios similares, en los autotriploides tres, en los autotetraploides cuatro, etcétera.

Los autodiploides pueden originarse por duplicación del número de cromosomas en un tejido somático con supresión de la citocinesis, o bien por formación de gametos con un número no reducido de cromosomas.

La meiosis de un autotriploide es más irregular que la de un autotetraploide. En general, los autodiploides de número impar son más estériles debido a que sus gametos tienen un número desequilibrado de cromosomas. En un autopoliploide hay tres o más cromosomas que se asocian para formar cromosomas *multivalentes*. En el paquinema siempre se hallan dos cromosomas en un segmento determinado, cualquier

sea el número de homólogos y el lugar de contacto durante el apareamiento.

Poliploidía en los animales. La escasez de poliploides en animales se debe al carácter bisexual que caracteriza a la mayoría de las especies. Esto implica un mecanismo especial en el que el sexo es determinado por la segregación de un par de cromosomas sexuales diferenciados. El hecho de que uno de los sexos tenga dos tipos diferentes de gametos, X e Y o X y O (O significa ausencia de otro cromosoma sexual), crea una dificultad que conduce a la esterilidad o a la aparición de anomalías sexuales. Si se produce la poliploidía, el equilibrio genético que existe entre los cromosomas sexuales y los autosomas se altera y la raza o especie puede desaparecer debido a la esterilidad.

Diversas especies de anfibios presentan poliploides bisexuados espontáneos. Se han descrito especies con 104 cromosomas en la mitosis, y octovalentes en la meiosis. En estas poliploidías el contenido de ADN aumenta correlativamente.²

La poliploidía permite investigar la expresión de los genes en dosis múltiples, y a tal efecto se han realizado determinaciones de seroalbúmina, hemoglobina y de varias enzimas en anfibios.³ En éstos se estudiaron individuos triploides, tetraploides, pentaploides y aneuploides, inducidos experimentalmente mediante cambios de temperatura.⁴ Un caso de poliploidía en mamíferos es el del roedor *Cricetus cricetus*.⁵ Frecuentemente se hallaron células con complejos cromosómicos reduplicados en animales y en tejidos patológicos.

Es posible inducir la poliploidía empleando sustancias como la colchicina, acenafteno, heteroauxina, veratrina, y también por la exposición al calor o al frío. El más utilizado es el alcaloide colchicina. Las semillas se sumergen en ella al comienzo de la germinación; esta sustancia, asimismo, puede ser inyectada en plantas jóvenes.⁶

La droga inhibe la formación del huso, por lo cual la división celular no se completa. Cuando ha pasado algún tiempo, las células recuperan su actividad normal, pero con un número doble de cromosomas. Son muchas las posibilidades que ofrece, desde el punto de vista teórico y práctico, la producción experimental de poliploides.



FIG. 14-15. Serie poliploide (x , $2x$, $2x + 1$, $3x$ y $5x$) en *Crepis*. (De Navashin.)

Alopoliploidía

Este tipo de variación cromosómica ocurre por el cruzamiento entre dos especies con distinto número de cromosomas. El híbrido resultante tiene diferente número de cromosomas que el de los padres. Por ejemplo, el sorgo negro argentino (*S. almun*) es un alotetraploide ($2n = 4x = 40$) originado en la naturaleza por cruzamiento interespecífico entre *S. halepense* ($2n = 4x = 40$) y *S. sudanense* ($2n = 2x = 20$) (fig. 14-16). En este caso, la fecundación se produce entre un gameto anormal no reducido y uno normal de la otra especie. En la mayoría de las ocasiones, los cruzamientos entre especies distantes dan lugar a híbridos diploides estériles.

Sin embargo, algunas veces se forma un organismo fértil por duplicación de los cromosomas del híbrido, que produce gametos equilibrados y genera un individuo alotetraploide (AA BB). El estudio de la meiosis en alopoliploides tiene importancia para determinar las especies que han tomado parte en la formación de un híbrido y proporciona información acerca de la probable filogenia.

Aneuploidía

Cuando se reduplican uno o más cromosomas, se dice que el organismo es *polisómico*. Se trata de un tipo especial de aneuploidía

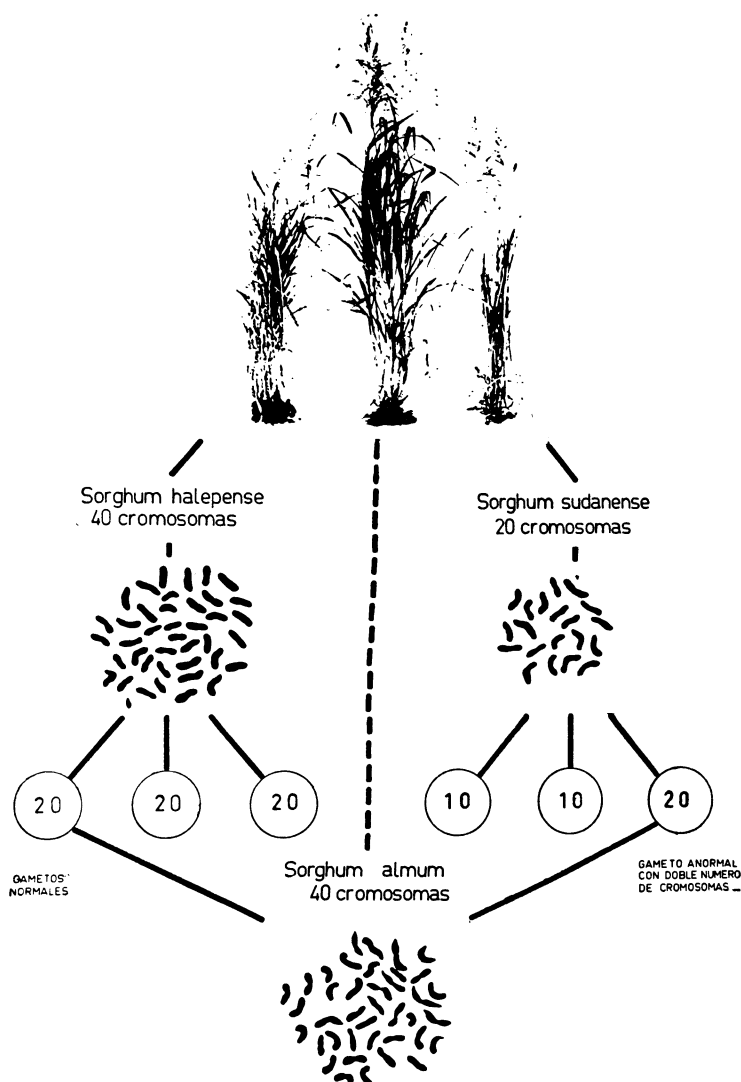


FIG. 14-16. Origen del sorgo argentino (*Sorghum almun*) alotetraploide, por cruzamiento de *Sorghum halepense* ($2n = 4x = 40$) con un sorgo diploide ($2n = 2x = 20$), en el cual se produjo la fecundación entre un gameto no reducido ($x = 20$) del sorgo diploide con un gameto normal ($x = 20$) de *S. halepense*. Se ilustran los cromosomas somáticos de los padres y del híbrido. (Según Sáez y Núñez, 1949.)

causado por una falla en la separación de los cromosomas durante el proceso meiótico. Uno de los cromosomas, junto con su homólogo, pasa al mismo polo y se incorpora al mismo gameto. A este fenómeno también se lo designa como *no disyunción*. El gameto así formado, al unirse con otro normal, dará origen a un individuo *trisómico* ($2x + 1$). Este tipo de aberración es muy importante en el género humano donde puede producir *mongolismo* (véase cap. 15). En la tabla 14-2 se indican otras clases de aneuploidía (organismos *monosómicos* y *nulisómicos*).

Desde el punto de vista genético los monosómicos son interesantes por tener genes sin pareja (a los genes les falta un homólogo). Esto permite seguir la distribución de genes recesivos localizados en el elemento no apareado y determinar los valores de "ligamiento" y de *crossing-over* en la descendencia.

Endomitosis, politenia, polisomatia y reducción somática

Mucho interés han despertado los procesos que tienen lugar durante la diferenciación y desarrollo de las células que ya no se dividen. En el cangrejo de mar, *Gerris lateralis*, Geitler halló un fenómeno de reduplicación con la separación posterior de los cromosomas sin que se produjera formación del huso ni desaparición de la membrana nuclear. Denominó a este proceso *endomitosis*. La reduplicación puede ser tan acentuada que el número diploide de cromosomas (normalmente = 21) llegue hasta 1024 y 2048.

En la hoja epitelial de los testículos de los ortópteros se encuentran núcleos endopoliploides o polisómicos con alto grado de poliploidía.

En las células tumorales de tipo ascítico y en los tumores sólidos de los mamíferos, es muy común hallar reduplicación y poliploidía. La reduplicación de los cromosomas se produce por dos mecanismos, *politenia* y *polisomatia*. En el primer caso, las cromátidas hermanas no se separan y se forma entonces un cromosoma politénico multifilamentoso (véase capítulo 3). En el segundo caso, la separación de las cromátidas hermanas da por resultado un poliploide somático con cromosomas, que tienen filamentos normales. Entre ambos extremos sólo existen diferencias de grado, puesto que la politenia es un ejemplo del fenómeno general que se conoce como *endopoliploidia*. Existen casos en que en una misma célula coexisten la politenia y la polisomatia, como en el género *Lestodiplosis*.⁶

Como resultado del estudio de la polisomatia en relación con el proceso de diferenciación, se puede demostrar que los tejidos con alta actividad mitótica presentan también mayor constancia en el número de cromosomas. Cuando la división es más lenta que la reduplicación, ocurre la politenia y la polisomatia. Por el contrario, si la división celular es más rápida que la reduplicación o si aquélla tiene lugar después de la poliploidía, se produce el fenómeno de la *reducción somática*, en la que hay una disminución del número de cromosomas. Este tipo de cambio fue observado en los vegetales superiores y en algunos

insectos. La reducción somática es un fenómeno común en la naturaleza y su frecuencia puede aumentar experimentalmente por diversos tratamientos.⁷

Variación somática en el número de cromosomas

Un problema que se está estudiando con considerable interés es el relativo a la variabilidad del número de cromosomas en las células somáticas de diversos organismos y particularmente de los mamíferos. Estos estudios tienen también vasta aplicación en patología humana. Dicha variación, denominada *aneuploidia somática* se observó en varios tipos de tejidos de vertebrados, incluyendo al hombre.

Un ejemplo de ella es la *segregación somática*, en la cual de una mitosis somática se originan dos células hijas genéticamente distintas. El proceso puede conducir a células individuales que, en diferentes tejidos o partes del cuerpo, son susceptibles de tener un número disímil de cromosomas somáticos; por ejemplo: mosaicos individuales, ginandromorfos, etcétera. Existen diversas causas para que se produzca este cambio curioso; entre otras, las endomitosis, la reducción somática, el *crossing-over* somático, la fragmentación y eliminación de cromosomas, etcétera.

Variación de los cromosomas en el cáncer.

En los cultivos de tejidos la variación cromosómica es común especialmente después de varios pasajes. Estos cambios pueden llevar a la transformación maligna del tejido, pero ello no sucede siempre en todos los casos.

El estudio de las variaciones que se producen en las poblaciones celulares de tumores está apenas en el comienzo. En mamíferos, el análisis citogenético de diferentes tipos de tumores ha conducido a que se los considere como cariotipos alterados de indudable inestabilidad genética y citológica.

La mayoría de los tumores ascíticos de ratas se encuentran constituidos por tipos celulares mixtos, los cuales poseen una variabilidad en su contenido cromosómico que oscila alrededor de un número, que es diferente del complemento diploide de la especie (aneuploidía). Como las células que tienen el mismo juego de cromosomas pueden perpetuarse por medio de trasplantes, se pensó que éstas eran la línea celular primordial del tumor y las poblaciones celulares, variantes de esa "línea primordial".

El concepto de líneas primordiales se ha extendido^{8,9} a los tumores primarios de los ratones,¹⁰ en cuya investigación se aplicaron métodos serológicos¹¹ y al cultivo de colonias celulares aisladas.¹²

EFFECTO GENÉTICO DE LAS RADIACIONES

Muller, Altenburg y Stadler¹³⁻¹⁶ descubrieron independientemente el efecto mutagénico de las radiaciones. Haciendo actuar rayos X sobre *Drosophila*

melanogaster, cebada y maíz, comprobaron un aumento considerable en la frecuencia de mutaciones. Las radiaciones ionizantes (por ejemplo, rayos X, radiaciones λ , radiaciones β , neutrones rápidos, neutrones lentos, y rayos ultravioletas) y cualquier otro tipo de agente mutagénico son capaces de inducir mutaciones puntiformes o aberraciones cromosómicas.

En diferentes organismos se demostró que el número de mutaciones inducidas por radiación es proporcional a la dosis. La figura 14-17 evidencia, en el caso de *Drosophila*, que la relación sigue una función lineal entre 25 y 9000 unidades Roentgen (r).*

Los efectos de las radiaciones son acumulativos por largos períodos de tiempo. Por ejemplo, con 0.1 r por día durante 10 años es suficiente para aumentar el grado de mutación alrededor del 150 por ciento del nivel espontáneo.

En los mamíferos, los efectos de las radiaciones "agudas" (por ejemplo, en un período de segundos o minutos) y "crónicas" (por ejemplo, una exposición baja, fraccionada o continua, separada por días o semanas) ocasionan diferentes grados de mutación. Una exposición aguda de 20 r en células humanas basta para inducir rupturas cromosómicas en cada célula. En el ratón, con una dosis aplicada crónicamente a los testículos, las espermatogonias manifiestan menos mutaciones que cuando la radiación actúa en forma aguda con altas intensidades.^{17, 18} En la *Drosophila*, el efecto mutagénico es equivalente en ambos tipos de tratamiento.

* El roentgen r es la cantidad de radiación suficiente para producir dos iones por micrón cúbico y se define como la radiación necesaria para liberar una unidad electrostática en 0.001293 g de aire.

Aberraciones cromosómicas

Las radiaciones pueden inducir una fragmentación cromosómica y, por tanto, una aberración o alteración estructural. En contraste con las mutaciones génicas, las aberraciones cromosómicas no aumentan en proporción directa con la dosis, sino más bien en forma exponencial (fig. 14-18). Se produce mayor cantidad de aberraciones cromosómicas por un tratamiento continuo que por uno intermitente.

Las dosis bajas pueden no ser suficientes como para producir dos fracturas en un cromosoma. Al aumentarlas, el número de rupturas se incrementa y las "fusiones aberrantes" se hacen cada vez más frecuentes. Con una sola dosis de baja intensidad existe mayor posibilidad de que la ruptura pueda "recomponerse" como en la estructura original, antes que ocurra una segunda ruptura capaz de suscitar la aberración.

Hay tres tipos principales de alteraciones estructurales que pueden ser inducidas por las radiaciones ionizantes: a) *tipo cromosómico*, en el cual se fracturan las dos cromátidas; b) *tipo cromátida*, en el que es afectada sólo una de ellas y c) *tipo subcromátida*, en el que se fractura la mitad de una cromátida.

Las aberraciones de las cromátidas tienen lugar en aquellas regiones cromosómicas en las que la irradiación es posterior a la síntesis de ADN, mientras que las aberraciones *cromosómicas* se producen en los sitios que todavía no han duplicado su ADN. La irradiación causa generalmente lesiones localizadas, que luego pueden estabilizarse ocasionando deficiencias localizadas (fig. 14-19). Después de algún tiempo, estas deficiencias son susceptibles de repararse por polimerización de nuevo ADN¹⁹ y el proceso

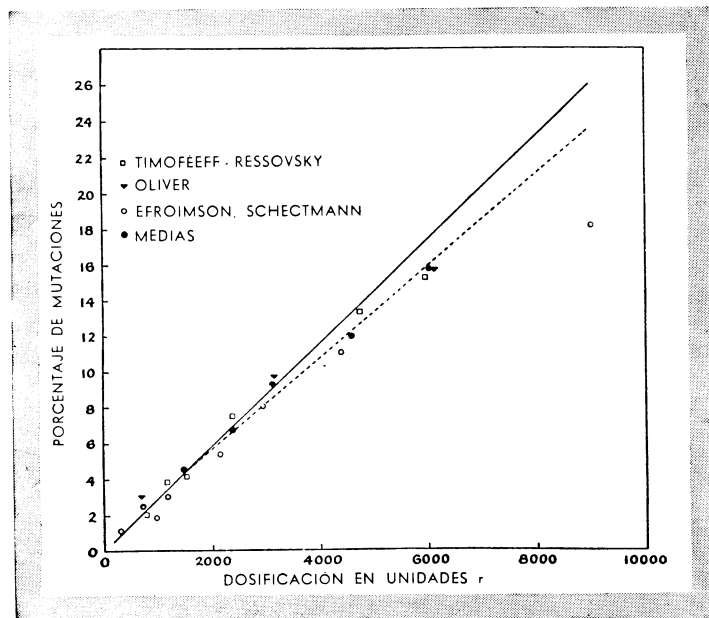


FIG. 14-17. Relación entre dosis de rayos X y frecuencia de mutaciones letales en la *Drosophila melanogaster*. (De Timofeeff, Ressovsky, Zimmer y Delbrück.)

conduce a la restitución completa de la estructura original (*reparación verdadera*). Si no existe reparación, la lesión se estabiliza y se hace visible con el microscopio. El proceso de restitución es inhibido por el frío, el cianuro y el dinitrofenol. El oxígeno aumenta el número de fracturas e intercambios cromosómicos (fig. 14-17).

Si se induce sólo una ruptura en un cromosoma se observará una pequeña deficiencia. Las aberraciones que resultan de dos rupturas (traslocaciones, inversiones y grandes supresiones) dependen de la dosis (fig. 14-18). La frecuencia de dos rupturas simultáneas es proporcional al cuadrado de la dosis de irradiación.^{20, 21}

Con dosis elevadas, las aberraciones cromosómicas que requieren más de una ruptura se cuentan en mayor número que las que dependen de una sola ruptura. Así, en *Tradescantia*, la curva de frecuencia de traslocaciones permanece cercana a cero con dosis bajas y aumenta rápidamente con dosis más altas.^{22, 23}

Como hemos visto en la sección de aberraciones cromosómicas, cuando se fractura un cromosoma, los dos fragmentos vuelven a unirse o se mantienen separados en forma permanente.

Si en vez de ocurrir la restitución inmediata, los

extremos fracturados se duplican para formar dos cromátidas, los fragmentos provistos de centrómero se distribuyen en polos diferentes y los fragmentos acéntricos son eliminados (fig. 14-20, A). A veces puede suceder que los fragmentos hijos se dupliquen y se unan formando un cromosoma dicéntrico y otro acéntrico.

Durante la mitosis, los centrómeros del cromosoma dicéntrico se dirigen hacia polos opuestos y forman un puente entre los núcleos hijos, que finalmente se rompe en algún punto (fig. 14-20, B). De ese modo, las dos células hijas reciben cromosomas no equilibrados con deficiencias. En la mitosis siguiente se repite el mismo ciclo, produciéndose aberraciones cromosómicas que comprenden nuevas "rupturas-fusiones y puentes", que dan lugar a nuevos genotipos.^{24, 25}

En el hombre, por exposiciones agudas (irradiaciones médicas fuertes, accidentes atómicos, guerra atómica) se inducen rupturas dobles o múltiples, en tanto que con dosis bajas se originan rupturas cromosómicas únicas.

Se han observado aberraciones cromosómicas en cultivos de sangre humana de personas sometidas a radiaciones o a la inyección de sustancias radiactivas.^{26, 28}

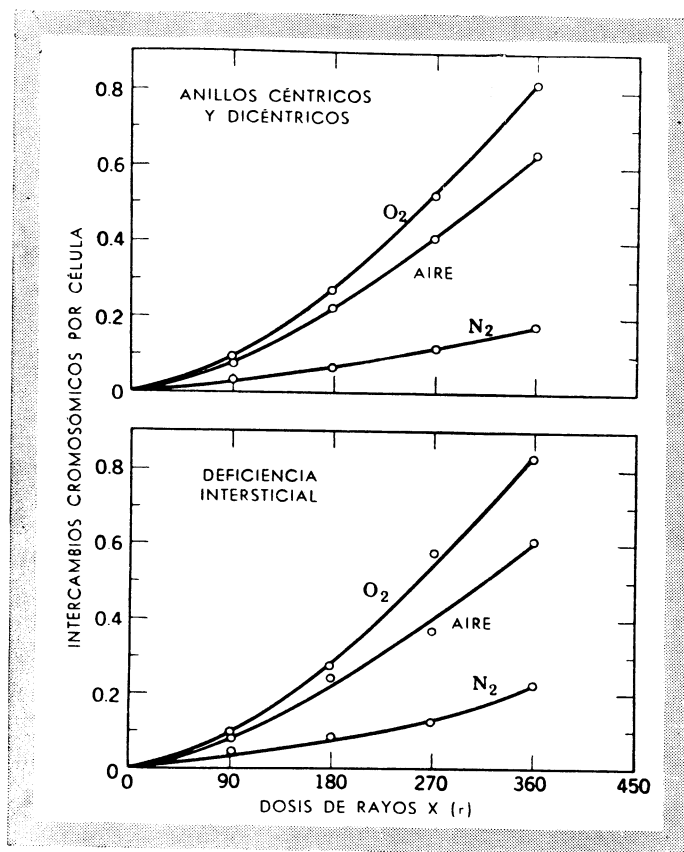


Fig. 14-18. Curvas de dosis de rayos X mostrando las aberraciones cromosómicas inducidas en *Tradescantia*, en presencia de oxígeno, aire y nitrógeno. (De Giles y Riley.)

Mutaciones de células somáticas y cáncer

Recientemente ha sido estudiado el efecto que producían las radiaciones en las células durante los vuelos espaciales en las cápsulas Géminis III y IV.²⁹ En células sanguíneas no fue posible descubrir aberraciones cromosómicas. La dificultad en la obtención de material humano para el estudio de cromosomas meióticos impide determinar aberraciones que no sean las observadas en células somáticas.

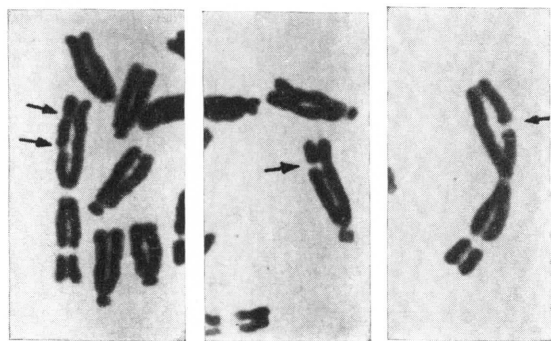


FIG. 14-19. Rupturas (flechas) de cromátidas producidas por radiación. (De H. Evans.)

Las mutaciones somáticas no se transmiten de generación en generación pero producen cambios graves en el individuo, los cuales dependen del tipo de célula y del momento en el que tiene lugar la mutación. La radiación puede afectar tejidos cuyas células continúan dividiéndose, lo mismo que tejidos que no se dividen más. Si la mutación sobreviene en una etapa temprana del desarrollo embrionario, alterará gran número de células. La mayoría de los genes mutados son recesivos y por tanto no se manifiesta su efecto mientras el individuo sea heterocigótico. En cambio, si una célula se hace homocigótica en la descendencia, el efecto fenotípico se manifestará inmediatamente. Es probable que algunos casos de cáncer producidos en individuos irradiados se originen por mutaciones somáticas.

Mutaciones en células germinativas

En contraste con las mutaciones somáticas, que sólo repercuten sobre las células del mismo individuo, las mutaciones de las células germinativas pueden ser transmitidas a la descendencia. En la mayor parte de los casos de irradiación, se ven afectadas tanto las células somáticas como las germinativas.²⁵

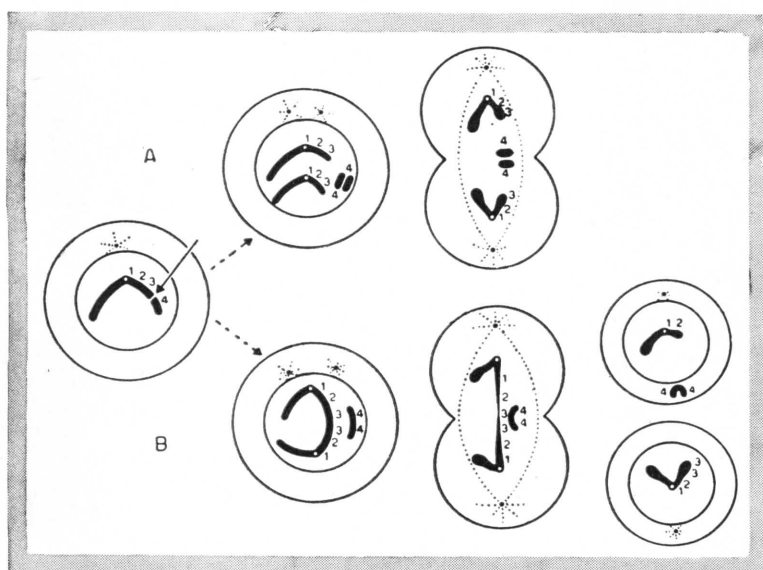


FIG. 14-20. Una sola fractura en un cromosoma entre los puntos 3 y 4. A Las dos partes del cromosoma fracturado se reduplican; los fragmentos con el centrómero se distribuyen en polos opuestos y los fragmentos sin centrómero permanecen en la región ecuatorial y son eliminados. B Las dos partes del cromosoma fracturado se reduplican y los extremos rotos se unen, formando un cromosoma con centrómero y otro cromosoma sin centrómero. Durante la mitosis, los dos centrómeros se mueven hacia polos opuestos y el segmento situado entre ellos se fractura. Las dos células hijas reciben cromosomas con constitución diferente. El fragmento sin centrómero es eliminado. (De Stern, 1960.)

Aun las dosis más pequeñas de radiación son genéticamente perjudiciales y su efecto es tan peligroso en el organismo más simple como en el hombre.³⁰⁻³⁴ Sin embargo, en microorganismos o vegetales, entre las numerosas mutaciones deletéreas, se pueden obtener algunas pocas útiles. Este método se emplea, por ejemplo, en la obtención de nuevos antibióticos y vegetales con alto valor económico.

Actualmente se sabe que en el proceso de mutación puede ocurrir una serie de interferencias entre la ionización inicial producida en el tejido por la radiación y la mutación final. Por ejemplo, en una atmósfera de oxígeno las mutaciones se producen con mayor frecuencia, mientras que en una de helio o nitrógeno la frecuencia disminuye (fig. 14-18). Las consecuencias biológicas de las radiaciones pueden disminuir en presencia de protectores químicos apropiados.

ACCIÓN CITOGENÉTICA DE LOS AGENTES QUÍMICOS

El descubrimiento de la acción de la colchicina sobre la división celular de animales (Lits, 1934) y vegetales (Dustin, Havas y Lits, y P. y N. Gavaudan y Pompriaskinsky-Kabozieff, 1937) aumentó el interés por los efectos de diversas sustancias químicas. Desde el punto de vista citogenético, la primera poliploidización producida por la colchicina abrió nuevas posibilidades en la genética teórica y aplicada.

La acción de la colchicina en el proceso de la mitosis ha conducido a experimentar con otras sustancias en la esperanza de dilucidar la fisiología de la mitosis normal y anormal, así como también el mecanismo de la mutación genética. El efecto más frecuente de los agentes químicos es la inhibición de la mitosis y de la meiosis si bien algunos pueden estimularlas.

La acción inhibitoria da como resultado: 1) configuraciones cromosómicas que facilitan el recuento y análisis del cariotipo; 2) poliploidía con todas las posibles aplicaciones prácticas; 3) descubrimiento de sustancias con acción mutagénica o anticancerosa; 4) información sobre los mecanismos básicos de la acción inhibitoria.³⁵ Estos mismos estudios efectuados en la meiosis proporcionan datos indirectos acerca de la fisiología del apareamiento y del *crossing-over*.

Por lo general, las observaciones se hacen inmediatamente después que la sustancia actúa sobre el espécimen. Si éste sobrevive, se lo puede mantener en un medio normal para estudiar los efectos resi-

duales o la recuperación al cabo de cierto período de tiempo.

Los inhibidores del proceso mitótico o meiótico se denominan generalmente "venenos mitóticos".³⁶ Los agentes activos son endógenos (producidos naturalmente en los tejidos) o exógenos (originados fuera del organismo).³⁷

Las sustancias activas pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química, pero es más útil estudiar sus diferentes efectos y los posibles mecanismos de acción. El agente puede inhibir diferentes etapas de la mitosis o todas ellas, con distinta intensidad. También puede actuar sobre uno o varios de los elementos que intervienen en el ciclo mitótico, por ejemplo: ciclo de la membrana nuclear, espiralización de los cromosomas, duplicación de los cromosomas, ciclo nucleolar, metabolismo del ADN, del ácido ribonucleico (ARN) nuclear y citoplásmico y de las proteínas, aporte energético para la mitosis y meiosis, etcétera.

Los agentes químicos que tienen acción mitótica pueden agruparse de la siguiente manera:

Sustancias que actúan en la profase e interfase

Algunas sustancias producen su efecto en la etapa crítica de la duplicación de los cromosomas.

Ciertos agentes químicos actúan como inhibidores de la oxidación (cianuro, azida, etc.) o de la fosforilación oxidativa (2-4-dinitrofenol), que proporcionan la energía para la mitosis, es decir, inhiben el comienzo del proceso mitótico, pero no la duplicación. Los cambios morfológicos consisten en la ausencia de las fases mitóticas, pero con un aumento del volumen nuclear.

Otros agentes actúan sobre el metabolismo de los hidratos de carbono (como los glucocorticoides suprarrenales) o interfieren con el proceso de duplicación, modificando el metabolismo del ADN y de las proteínas. Son importantes las sustancias que ocasionan rupturas cromosómicas similares a las causadas por radiaciones ionizantes. Reciben el nombre de *radiomiméticas* y como ejemplo se puede citar a las mostazas nitrogenadas. En general, los resultados morfológicos y genéticos son mejor conocidos que su mecanismo de acción.

Una observación frecuente es la fractura cromosómica seguida de la reorganización de los filamentos, como sucede con el efecto de las radiaciones. Las investigaciones con agentes químicos indican que los cromosomas presentan puntos de mayor sensibilidad, comúnmente localizados en las zonas heterocromáticas. Entre ellas, la zona centromérica merece una mención especial porque es la que se rompe con mayor frecuencia. Este efecto no se observa con las

radiaciones.³⁸ Cuando el agente posee una acción intensa, puede causar la desintegración del núcleo. Durante el proceso se observa la expulsión de "gotas de ADN" en el citoplasma, vacuolización nuclear y finalmente lisis nuclear.³⁹

Acción en la metafase y en etapas posteriores

La acción se denomina *mitosis C*, puesto que el principal agente que produce estas alteraciones es la colchicina. Se trata de un alcaloide que afecta primordialmente la formación y fisiología del huso, aunque también actúa sobre los cromosomas. La acción sobre el huso conduce a diversos grados de bloqueo de la división en la metafase y anafase. Como la duplicación cromosómica no está alterada, puede producirse poliploidía. Por efecto de la colchicina los cromosomas son capaces de continuar el ciclo de espiralización y las cromátidas aparecen muy contraídas y repeliéndose entre sí, pero todavía se mantienen vinculadas por el centrómero (configuración "en esquí").

La acción de la colchicina sobre los microtúbulos del huso se estudiará en el capítulo 22.

Acción mutagénica de sustancias químicas

Muchos agentes son susceptibles de producir mutaciones en vegetales y animales; por ejemplo: sustancias cancerígenas, peróxidos, formol, fenol y derivados de los nucleótidos. En los microorganismos se han obtenido datos más precisos acerca de la frecuencia de la mutación. En este caso, fue de gran ayuda el empleo del *quimiostato*, aparato compuesto por un recipiente con una suspensión de bacterias, a la que se le agrega continuamente el medio de cultivo junto con el mutágeno.⁴⁰ Las purinas, como cafeína y adenina, aumentan la velocidad de mutación cuando son incorporadas en forma continua al medio. En cambio, algunos ribósidos púricos como adenosina, guanosina e inosina invierten ese efecto. Las sustancias que disminuyen la velocidad de mutación se conocen como *antimutágenos*. Se ha sugerido que las mutaciones espontáneas pueden estar determinadas por un desequilibrio entre sustancias mutagénicas y antimutagénicas como la adenina y la adenosina, que son metabolitos naturales.

Un derivado de la timidina, la *5-bromodesoxiuridina*, es capaz de dañar ciertas regiones especiales de los cromosomas de mamíferos, una de las cuales es el telómero. Se interpreta que estas regiones son ricas en pares de adenina-timina (A-T; véase capítulo 17).⁴¹ Otro mutágeno, la *hidroxilamina*, que probablemente desamina a la citosina, posee un efecto especial sobre la región centromérica y otras regiones de algunos cromosomas del hamster. Se ha supuesto que en estas regiones abundan los pares de guanina-citosina (G-C). Tanto las regiones afectadas por la *5-bromodesoxiuridina* como por la *hidroxilamina* son específicas para cada par de cromosomas.⁴²

Mientras que las radiaciones producen rupturas y otros daños cromosómicos al azar, los agentes nombrados más arriba actúan específicamente sobre ciertas regiones. La acción de la bromodesoxiuridina se manifiesta sólo cuando las células se encuentran en el período de síntesis S (véase cap. 17). La droga no posee efecto sobre el período G₂. Del mismo modo, la *5-fluorodesoxiuridina*, un inhibidor de la enzima timidilato-sintetasa sólo actúa sobre células que duplican el ADN.

Otros agentes mutagénicos con acción sobre los ácidos nucleicos son las acridinas, como el naranja de acridina y la proflavina. Algunas de estas sustancias fluorescentes pueden sensibilizar ADN por la acción de la luz (acción fotodinámica del colorante). *In vitro*, las moléculas de acridina son susceptibles de intercalarse entre los nucleótidos de ADN y, por tanto, de alterar la lectura del mensaje genético e inactivar los genes. La acción mutagénica del ácido nitroso será mencionada en el capítulo 19, donde se demostrará que estos agentes desempeñan un papel importante en el análisis del código genético. Para una revisión sobre la acción mutagénica de sustancias químicas, véase ⁴³.

Agentes estimulantes

Un problema interesante es el descubrimiento de los factores que inician la división celular. Se ha sugerido que existe una sustancia que comienza la división, y en 1955, se aisló la *quinetina* (6-furfurilaminopurina) del ADN de diversas fuentes. Esta sustancia aumenta la velocidad de la mitosis en el meristema del *Allium*. En bajas concentraciones, disminuye la duración de la interfase y acelera la velocidad de la mitosis. Algunas hormonas obran también como agentes estimulantes en ciertas condiciones experimentales (por ejemplo, la insulina y la adrenocorticotrofina); es probable que actúen sobre el metabolismo de los hidratos de carbono de la mitosis.

CITOGENÉTICA Y EVOLUCIÓN

El estudio de la evolución tomó gran impulso gracias al desarrollo de la Citología comparada y de la Citogenética. McClung y J. Navashin fueron los primeros en destacar la importancia de ésta en las investigaciones aplicadas a la taxonomía y la evolución mediante la comparación de los genomas de especies emparentadas. La sistemática experimentalizó un progreso considerable por el aporte de la Citogenética, que actualmente proporciona muchos de los mejores métodos para dilucidar intercorrelaciones entre diferentes categorías taxonómicas. En general, familias, géneros y especies se caracterizan por tener distintos sistemas genéticos.

El estudio del cariotipo de diversas especies ha establecido una serie de hechos de gran interés, tanto en el reino animal como en el vegetal (véanse cap. 3 y tabla 3-1). En poblaciones salvajes se demostró que los individuos son, en cierto grado, citológica y ge-

néticamente heterocigóticos. En algunos casos, los genes, aun siendo idénticos, están ordenados de manera distinta, debido a alteraciones ocurridas en los segmentos cromosómicos. Estos cambios desempeñaron un papel preponderante en el mecanismo de la formación de las especies.

La mayoría de las especies vegetales se han originado por un cambio abrupto y rápido en la naturaleza, y las principales fuentes de variación son la aneuploidía y la poliploidía. La poliploidía no es tan importante en el reino animal. Entre los vertebrados, diferentes especies de peces tienen distinto número de cromosomas. Los anfibios, especialmente los anuros, se caracterizan por la presencia de un número fijo para cada familia. Los reptiles y las aves poseen grandes cromosomas (macrocromosomas) y pequeños cromosomas (microcromosomas), que sirven para diferenciarlos citológicamente.

Debido a alteraciones estructurales, el número de centrómeros puede aumentar o disminuir. Navashin considera que la variación en el número de cromosomas se debe al hecho de que los centrómeros no pueden originarse *de novo*, y esta hipótesis ha sido confirmada experimentalmente en el reino animal y en el vegetal. Matthey distingue entre el número básico de cromosomas y el número de brazos cromosómicos, también denominado número fundamental (NF). De acuerdo con este concepto, existen *dos* brazos en el cromosoma metacéntrico y *uno* en el cromosoma acrocéntrico o telocéntrico. Ésta es una importante distinción en los grupos que tienen cromosomas acrocéntricos y metacéntricos. Se pueden establecer así comparaciones respecto del número de brazos de diferentes especies.

Otro método para estudiar la citogenética de la evolución es la medición del área cromosómica total y del contenido de ADN. Con dicho método se pusieron de manifiesto interesantes variaciones en diferentes órdenes de reptiles.⁴⁴

Son de particular importancia en la evolución dos cambios opuestos en el número (y la configuración) de los cromosomas (fig. 14-11):

a) La *fusión céntrica*, que conduce a la disminución en el número de cromosomas, por la unión de dos cromosomas acrocéntricos para producir uno metacéntrico (fig. 14-11, 1).

b) La *disociación* o *fisión*, que determina el aumento en el número de cromosomas; por ejemplo, uno metacéntrico (comúnmente grande) y un fragmento supernumerario, metacéntrico, experimentan una traslocación que dará lugar a dos cromosomas submetacéntricos o acrocéntricos (fig. 14-11, 2).

La fusión y la disociación constituyen los principales mecanismos por los cuales el número de cromosomas puede disminuir o aumentar durante la evolución de la mayoría de los animales y en algunos grupos de vegetales.

Cuando aumenta o disminuye el número de cromosomas, debido a una traslocación desigual, se debe considerar si el segmento llevado por el centrómero

es genéticamente activo o inerte; es decir, si es eucromático o heterocromático. De este modo fue posible explicar el mecanismo de evolución de los cromosomas en diversos grupos de vegetales y animales. Los estudios de cromosomas somáticos y politénicos, en varios cientos de especies de *Drosophila*, aclararon los conceptos de formación y evolución de este género, que ha sido analizado en sus aspectos genético, ecológico y geográfico.

La organización de los cromosomas y de los diferentes cariotipos observados en el individuo, la especie, el género y los grupos sistemáticos mayores indican que un mecanismo cromosómico interviene en el proceso de evolución. El problema de la evolución deberá ser enfocado desde los diferentes puntos de vista: bioquímico, citológico, genético y ecológico, empleándose todos estos criterios para analizar las intrincadas relaciones entre grupos de organismos, particularmente los que presentan variaciones acentuadas. Estos estudios pueden orientar al taxonomista y proporcionarle una base más firme para interpretar la evolución y filogenia de los organismos vivos.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Ashton, B. G.: (1967) *Genes, Chromosomes and Evolution*. Longmans, Green and Co., London.
- Auerbach, C.: (1967) The chemical production of mutations. *Science*, 158:1145.
- Bieseke, J. J.: (1958) *Mitotic poisons and the cancer problem*. Elsevier Pub. Co., New York.
- Darlington, C. D. and Bradshaw, A. D.: (1964) *Teaching genetics*. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Dobzhansky, T.: (1958) *Genetics and the origin of species*. 3rd ed. Columbia University Press, New York.
- Eigsti, O. J. and Dustin, P.: (1955) *Colchicine*. Iowa State College Press, Ames, Iowa.
- Evans, H. J.: (1968) Studies on chromosome damage following in vivo. Human Radiation Exposure. *Proc. roy. Soc. Edinb. B.*, 70:132.
- Evans, H. J.: (1962) Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. *Int. Rev. Cytol.*, 12:221.
- Evans, H. J.: (1967) *Radiation Research*. North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- Hayes, W.: (1964) *The genetics of bacteria and their viruses*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hollaender, A.: (1954) *Radiation biology*. 3 volumes. McGraw-Hill Book, Co., New York.
- International Symposium on genetics effects of space environments: (1968) *XII International Congress of Genetics*, Tokyo, 1.
- John, B. and Lewis, K. R.: (1965) The meiotic system. *Protoplasmatologia*, VIF. I, 1-335, Berlin.
- Lea, D. E.: (1955) *Action of radiations on living cells*. 2nd ed. Cambridge University Press, London.
- Levan, A.: (1967) Some current problems of cancer cytogenetics. *Hereditas*, 57:343.

- Lewis, K. R. and John, B.: (1963) *Chromosome marker*. J. & A. Churchill, London.
- Lewis, K. R. and John, B.: (1964) *The matter of mendelian heredity*. J. & A. Churchill, London.
- McElroy, W. D. and Glass, B. (eds.): (1957) *The chemical basis of heredity*. Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Neel, J. V.: (1963) *Changing perspectives on the genetic effects of radiation*. Charles, C. Thomas, Springfield, Ill.
- Sager, R. and Ryan, F. J.: (1961) *Cell heredity*. John Wiley & Sons, New York.
- Sinnot, E. W., Dunn, L. C. and Dobzhansky, T.: (1958) *Principles of genetics*. 5th ed. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Stern, C.: (1960) *Principles of human genetics*. 2nd ed. Freeman & Co., San Francisco.
- Stern, C.: (1967) Genes and people. *First in Biol. J. Med.*, 10:500.
- Swanson, C. P. (1957) *Cytology and cytogenetics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Taylor, J. H.: (1963) *Molecular genetics*, part I. Academic Press, New York.
- Taylor, J. H.: (1967) *Molecular genetics*, part II. Academic Press, New York.
- Taylor, J. H.: (1967) Meiosis. *Encyclopedia of Plant Physiology*, 18:344. Springer Verlag, Berlin.
- Wagner, R. P. and Mitchell, H. K.: (1964) *Genetics and metabolism*, 2nd, ed. John Wiley & Sons, New York.
- White, M. J. D.: (1961) *The chromosomes*. 5th ed. Methuen & Co., London.
- Wilson, G. B. and Morrison, J. H.: (1961) *Cytology*. Reinhold Publishing Corp., New York.
- Wolff, S.: (1963) *Radiation-induced chromosome aberrations*. Columbia University Press, New York.
- ces, p. 433. (Oncley, J. L., ed.) John Wiley & Sons, New York.
13. Muller, H. J.: (1927) *Science*, 66:84.
14. Muller, H. J.: (1928) *Ztschr. Abstam. Vererbungsl.*, suppl. 1:234.
15. Stadler, L. J.: (1928) *Science*, 68:186.
16. Altenburg, E.: (1928) *Amer. Naturalist.*, 62:540.
17. Russell, W. L.: (1954) In: *Radiation biology*, vol. 1, p. 825. (Hollaender, A., ed.) McGraw-Hill Book Co., New York.
18. Russell, W. L., Russell, L. B. and Kelly, E. M.: (1958) *Science*, 128:1546.
19. Evans, H. J.: (1967) *Radiation Research North Holland Publ. Co.*, Amsterdam.
20. Giles, N. H. and Riley, H. P.: (1949) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 35:640.
21. Giles, N. H.: (1955) *Brookhaven Symp. Biol.*, 8:103.
22. Sax, K.: (1940) *Genetics*, 25:41.
23. Sax, K.: (1941) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 9:93.
24. McClintock, B.: (1938) *Missouri Agric. Exp. Sta. Res. Bull.*, 240:48.
25. Muller, H. J.: (1954) In: *Radiation biology*. (Hollaender, A., ed.) McGraw-Hill Book Co., New York.
26. Tough, I. M., et al.: (1960) *Lancet*, 2:849.
27. Bender, M. A. and Goch, P. C.: (1962) *Radiat. Res.*, 16:44.
28. Boyd, E., Buchanan, W. W. and Lenox, B.: (1961) *Lancet*, 1:997.
29. Bender, M. A., Goch, P. C. and Kondo, S.: *Radiation Res.*, 34:228.
30. Muller, H. J.: (1956) *Acta genet. stat. med.*, 6:157.
31. Neel, J. V.: (1958) *Amer. J. hum. Genet.*, 10:398.
32. Turpin, R., Lejeune, J. and Rethore, M. O.: (1956) *Acta genet. stat. med.*, 6:204.
33. Puck, T. T.: (1959) *Rev. Mod. Physics*, 31:433.
34. Stern, C.: (1962) *Principles of human genetics*. Freeman and Co., San Francisco.
35. Wilson, G. B. and Morrison, J. H.: (1958) *Nucleus*, 1:45.
36. Bieseke, J. J.: (1958) *Mitotic poisons and the cancer problem*. Elsevier Publishing Co., New York.
37. D'Amato F. and Hoffman-Ostenhof, O.: (1956) *Adv. Genet.*, 8:1.
38. Darlington, C. D. and Koller, P. C.: (1947) *Heredity*, 1:187.
39. Sáez, F. A. and Drets, M.: (1958) *Port. Acta biol.*, ser. A, 5:287.
40. Novick, A.: (1956) Mutagens and antimutagens. *Brookhaven Symp. Biol.*, 8:201.
41. Hsu, T. C. and Somers, C. E.: (1961) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 47:396.
42. Somers, C. E. and Hsu, T. C.: (1962) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 48:937.
43. Auerbach, C.: (1967) *Science*, 158:1141.
44. Beçak, W., Beçak, M. L., Mazanth, H. R. S. and Ohno, S.: (1964) *Chromosoma*, 15:606.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- White, M. J. D.: (1954) *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press.
- Beçak, W.: (1969) Int. Symp. Nuclear Physiology and Differentiation. *Genetics*, 61:183.
- Beçak, W., Beçak, M. L. and Rebello, M. N.: (1967) *Chromosoma*, 22:192.
- Frankhauser, G.: (1945) *Quart. Rev. Biol.*, 20:20.
- Sachs, L.: (1952) *Heredity*, 6:357.
- Eigisti, O. J. and Dustin, P.: (1955) *Colchicine*. Iowa State College Press, Ames, Iowa.
- Huskins, C. L., Steinitz, L. M., Duncan, E. and Leonard, R.: (1947) *Rec. Soc. America*, 16:38.
- Levan, A.: (1956) *Amer. Acad. Sci.*, 63:774.
- Makino, S.: (1956) *Amer. Acad. Sci.*, 63.
- Ford, C. E., Hamerton, J. L. and Mole, R. H.: (1958) *J. cell comp. Physiol.*, 52:235.
- Hauschka, T. S.: (1958) *J. cell comp. Physiol.*, 52:197.
- Puck, T. T.: (1959) Quantitative studies on mammalian cells "in vitro". *Biophysical sciences*, p. 433. (Oncley, J. L., ed.) John Wiley & Sons, New York.

Determinación del sexo y citogenética humana

DETERMINACIÓN DEL SEXO

El hecho comúnmente observado de que los individuos del sexo masculino y del femenino se encuentran en proporciones más o menos iguales, fue el punto de partida para pensar que la determinación sexual está relacionada directamente con la herencia. Este estudio demostró que la “femineidad” y la “masculinidad” se transmiten de una generación a la otra del mismo modo que cualquier otro carácter hereditario.

Hoy se sabe que la determinación del sexo ocurre tan pronto como el óvulo es fecundado para formar el huevo o cigoto y que aquélla depende de los gametos. Las pruebas son de dos clases: a) fisiológicas y b) citológicas.

a) Entre las pruebas fisiológicas está el hecho de que los gemelos univitelinos —los que nacen de un solo huevo— siempre son del mismo sexo. Más aún, en ciertas especies que presentan un desarrollo poliembriónico (por ejemplo, el armadillo y la mulita) todos los embriones que provienen de un solo huevo fecundado son del mismo sexo.

b) Las evidencias citológicas fueron obtenidas por primera vez por McClung¹ con la demostración de que el complejo cromosómico o cariotipo de una célula, además de los cromosomas ordinarios o *autosomas*, presenta uno o varios cromosomas que se distinguen de los demás por su comportamiento y morfología especiales. A éstos se los denominó *cromosomas accesorios*, *allosomas*, *heterocromosomas* o *cromosomas sexuales*.

Los gametos en una determinada especie no son idénticos entre sí respecto de los cromosomas sexuales. Los individuos de un sexo se comportan como heterocigóticos y producen dos clases de gametos. Los del otro sexo, siendo homocigóticos, producen una sola clase

de gametos. Por tanto sólo son posibles dos tipos de fecundación, cuyo resultado será un 50 por ciento de machos y un 50 por ciento de hembras (figs. 13-12 y 15-1).

Cromosomas sexuales

En la mayoría de los organismos bisexuales (gonocóricos) diploides, existe un par de cromosomas, los cromosomas sexuales, que en el curso de la evolución se han especializado para la determinación del sexo. Uno de los sexos lleva un par de cromosomas sexuales idénticos (XX) y el sexo contrario un solo cromosoma X, que en algunas especies es impar (XO) y en otras forma pareja con un cromosoma Y (XY) (fig. 15-1). En muchas especies, la línea espermatogénica da lugar a dos clases de espermatozoides en proporciones semejantes. Por el contrario, en la línea ovogénica, el óvulo siempre tiene la misma clase de cromosoma sexual (fig. 13-12). Este tipo de determinación se ve en los mamíferos, incluso el hombre, y en ciertos insectos, como la *Drosophila*. En todos estos casos, mientras que el macho es heterogamético, la hembra es homogamética. En otros vertebrados (aves, algunos reptiles y peces) e invertebrados (insectos lepidópteros) la hembra es heterogamética y el macho homogamético, existen dos clases de óvulos (X e Y) y una sola clase de espermatozoides (todos X). En los ortópteros los machos son XO y las hembras XX. Por fin, hay algunos ejemplos en que el sexo está determinado por el cromosoma Y; en el axolote el sexo depende de la presencia o ausencia de dicho cromosoma.^{2,3}

En el hombre, el cromosoma Y es importante para determinar el sexo masculino. Así, un ser humano XO es semejante a una mujer pero carece de ova-

rios (síndrome de Turner). En cambio, un ratón XO es una hembra normal. Probablemente en la mayoría de los mamíferos el cromosoma Y es el determinante del sexo masculino. En algunos casos de partenogénesis, como en los himenópteros (abejas, avispas y hormigas), la determinación del sexo se realiza por un mecanismo haploide-diploide. Si la fecundación se produce, el individuo resultante será hembra; si

no se realiza, será macho. Debido a que todos los machos son haploides, hay en ellos una meiosis anómala, que no reduce el número de cromosomas (eliminación de un cuerpo polar anucleado).

Aunque en todos los animales existe un mecanismo genético de determinación del sexo, no siempre se distinguen los cromosomas sexuales y los genes determinantes del sexo están probablemente confina-

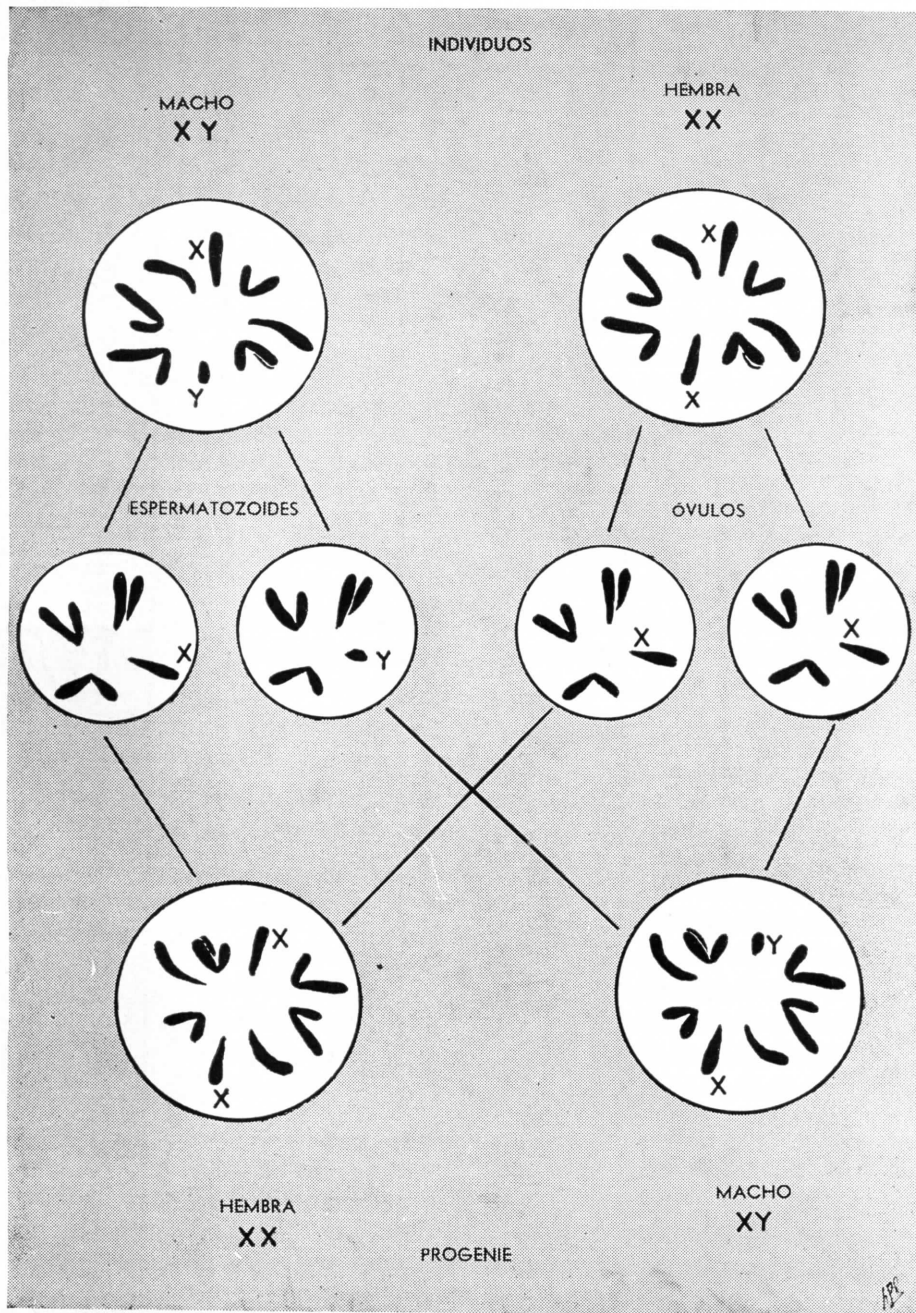


FIG. 15-1. Esquema de la determinación del sexo de acuerdo con el mecanismo XX-XY en la langosta sudamericana *Dichroplus silveira guidoi* con cuatro pares de cromosomas ($2n = 8$).

dos a una región muy corta de un par de cromosomas.

Puede considerarse al cromosoma sexual como compuesto por una *región homóloga* y una *diferencial* (fig. 14-6). La región homóloga corresponde al segmento que se aparea, y cuando se produce *crossing-over*, éste se limita a dicha zona (fig. 15-2). La región diferencial es la única que influye en la determinación del sexo.

Cromatina sexual y cromosomas sexuales

Barr y Bertram⁴ descubrieron en 1949 la existencia de un pequeño corpúsculo cromatínico (es decir un cromocentro) en las células nerviosas de gatos hembras, que estaba ausente en el macho. Estas observaciones fueron extendidas a otros tejidos y animales, incluyendo al hombre. El corpúsculo cromatínico —también denominado cromatina sexual o corpúsculo de Barr— se encuentra en los núcleos de la epidermis de hembras en proporción mucho mayor que en los machos (fig. 15-3).^{5,6}

Aparece en el núcleo interfásico de células de individuos hembras, como un pequeño cromocentro densamente teñido con los colorantes básicos, que da positiva la reacción de Feulgen (fig. 15-3) y tiene una posición relativamente constante para cada tejido y especie. Se lo puede hallar en cuatro formas diferentes: a) cerca del nucléolo (fig. 15-3, A) como en ciertas células nerviosas de muchas especies; b) en la cara interna de la carioteca (fig. 15-3, C), como en las células de la mucosa bucal y de la epidermis; c) libre en

el jugo nuclear (fig. 15-3, B), como en neuronas después de la estimulación eléctrica, y d) como una expansión nuclear (fig. 15-3, D). El ejemplo más típico de este último es el de los leucocitos neutrófilos, en donde aparece como un bastoncillo, denominado palillo de tambor ("drumstick"). Esta característica del leucocito ha sido empleada como una prueba para la determinación del sexo, junto con la investigación de células basales de la epidermis y extendidos de mucosa oral. El estudio de la cromatina sexual tiene amplia aplicación médica y ofrece la posibilidad de relacionar el origen de ciertas enfermedades congénitas con anomalías cromosómicas. Entre esas aplicaciones se encuentra el diagnóstico de estados intersexuales durante la vida posnatal y aun fetal. (Véase, más adelante, *Citogenética humana*).

La relación entre la cromatina sexual y los cromosomas se ha dilucidado recientemente, demostrándose que aquella deriva de uno solo de los cromosomas X. El otro se comporta como los autosomas y no presenta heteropicnosis durante la interfase. El número de corpúsculos de cromatina sexual es igual a $nX-1$.⁷ Ello significa que hay un corpúsculo de Barr menos que el número total de cromosomas X. Esta relación entre la cromatina sexual y los cromosomas sexuales es particularmente evidente en algunos seres humanos que tienen un número anormal de cromosomas sexuales (tabla 15-1).

Regulación de la cromatina sexual

De lo expresado anteriormente, se infiere que existe un mecanismo regulador o de *compensación de dosis* para los cromosomas X

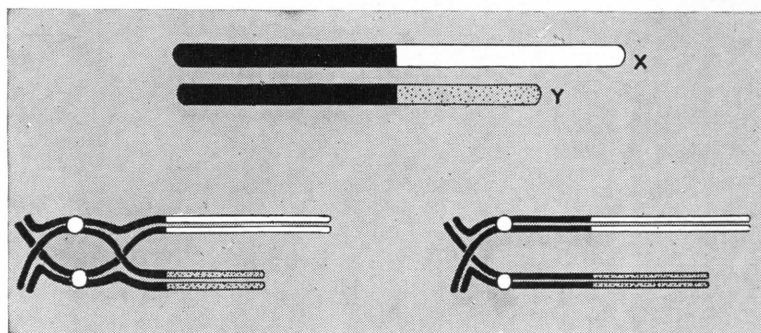


FIG. 15-2. Esquema de un par de cromosomas sexuales XY de un mamífero. En negro se representan los segmentos apareados y homólogos; en blanco, el segmento diferencial del cromosoma X, y en punteado, el del cromosoma Y. La configuración del bivalente depende de la posición de los quiasmas, que sólo se producen en el segmento homólogo.

de la hembra por el cual uno de ellos es heterocromático y genéticamente inactivo. Se admite que sólo una parte, no todo el cromosoma, se condensa en un corpúsculo de Barr. Dicha regulación tiene lugar aun con tres o cuatro cromosomas X; sin embargo, como se mencionará más adelante, en individuos con una dotación de cuatro cromosomas X, la regulación genética puede no ser completa.

El cromosoma X que se vuelve heteropícnótico puede ser de origen materno o paterno (fig. 15-5). Este fenómeno regulador comienza en el ser humano en el período blastocístico tardío, alrededor del decimosexto día de la vida embrionaria, y desde entonces permanece heterocromático en las células somáticas.⁸ Una regulación semejante existe en todos los mamíferos placentarios y sirve para preservar solamente un cromosoma X original en estado funcional, en cada célula somática.⁹ En el capítulo 17 se verá que la duplicación

del ADN tiene lugar en los cromosomas sexuales en un momento más tardío del período sintético y que este fenómeno es más evidente en el cromosoma X.

^{10, 11}

Heteropícnosis de los cromosomas sexuales

En la línea germinal de especies con una determinación del sexo de tipo XO o XY, los cromosomas sexuales son heteropícnóticos durante la gametogénesis. Por ejemplo, en los grillos, el cromosoma X es heteropícnótico negativo en la espermatogonia, heteropícnótico positivo en la primera profase meiótica y nuevamente negativo durante la metafase. Este fenómeno, también denominado *alociclia*, se interpreta como un mecanismo de tipo adaptativo tendiente a proteger los cromosomas sexuales, evitando el intercambio de ADN genéticamente activo durante la meiosis.

Vesícula sexual

En la mayor parte de los mamíferos, durante la meiosis, el par XY está incluido en la denominada "vesícula sexual" (fig. 15-4, I). Esta se pone de manifiesto principalmente en los períodos cigoteno

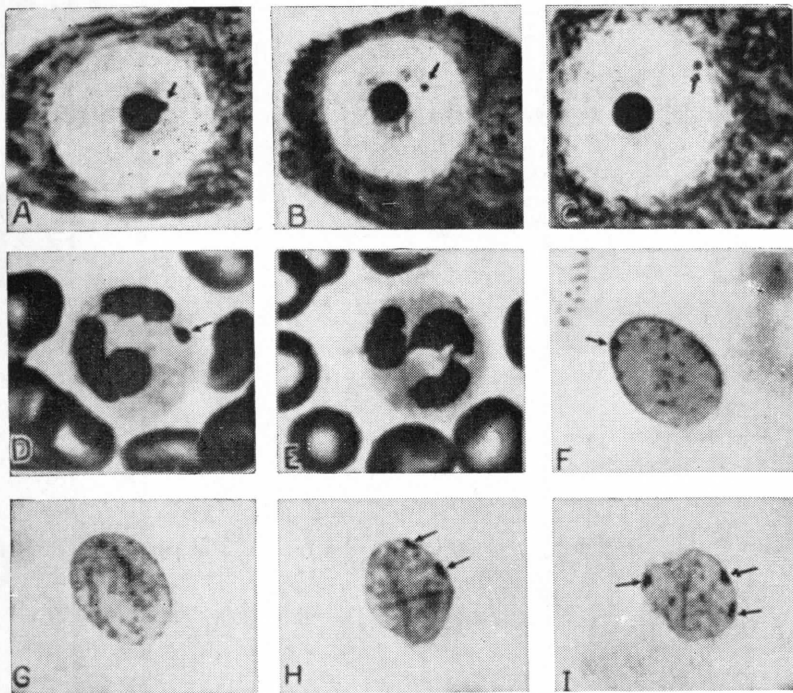


FIG. 15-3. *Cromatina sexual en una célula nerviosa de la gata.* A Cerca del nucléolo. B En el nucleoplasma. C Debajo de la membrana nuclear. (De M. L. Barr.) D Leucocito normal de mujer con el apéndice nuclear "en palillo de tambor" (*drumstick*). 1800 $\times$. E Lo mismo que D, en el hombre. El estudiante deberá recordar que el 90 por ciento de las mujeres muestran ausencia de palillo de tambor como en el hombre. 1800 $\times$. F Un corpúsculo de cromatina sexual (*flecha*) en el núcleo de un extendido de mucosa oral 2000 $\times$. G Lo mismo, pero del hombre. Obsérvese la ausencia de cromatina sexual. 1800 $\times$. H Núcleo de una mujer XXX con dos corpúsculos de cromatina sexual. Extendido vaginal. 2000 $\times$. I Lo mismo, de una mujer XXXX. Se indican con flechas los 3 corpúsculos de Barr. 2000 $\times$. (De M. L. Barr y D. H. Carr.)

y paquiteno de la meiosis, en el transcurso de los cuales los cromosomas XY no son heteropicnóticos. Al final de la profase, cuando la vesícula se desintegra, el bivalente XY resume su carácter heteropicnótico.

En el ratón, los cromosomas sexuales participan en la formación del nucléolo, es decir, contienen los organizadores nucleolares.¹⁰ En este caso, la vesícula posee dos zonas: la *cromática*, de forma oval y adherida a la membrana nuclear, y la *nucleolar*, rica en ARN y de forma de medialuna. Examinada con el microscopio electrónico, la zona cromática contiene microfibrillas de ADN delgadas y retorcidas, de 50 Å de diámetro, y una región filamentosa que contiene los componentes periféricos del complejo sinaptinémico (véase cap. 16). La zona nucleolar contiene ARN y es Feulgen negativa. En el centro posee un

cuerpo redondeado y denso, siendo el resto una estructura esponjosa que posee gránulos de alrededor de 150 Å¹¹ (fig. 15-6). La vesícula sexual humana carece de ARN y no existe formación de nucléolos en relación con ella. Con el microscopio electrónico no es posible identificar ni la zona nucleolar ni los gránulos.¹²

Sistema neo-XY de determinación del sexo

Además del tipo común de determinación del sexo basado en los cromosomas XY, en varias especies se ha observado un tipo especial denominado *sistema neo-XY*.

Como demuestra la figura 15-7 se produce la fractura del cromosoma X y la fusión posterior del frag-

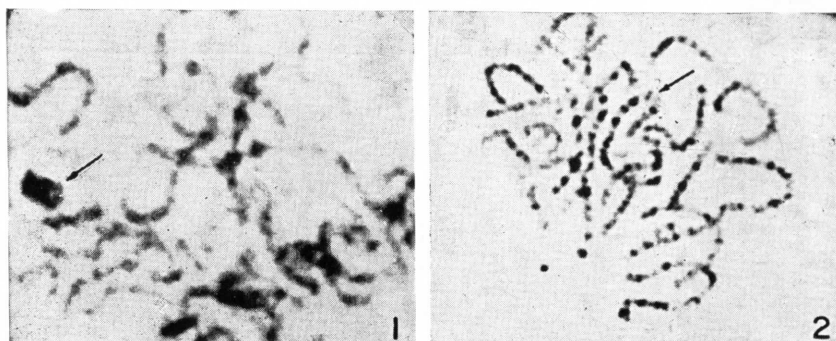


FIG. 15-4. 1 Estadio paquiténico en un espermatozoida de mulita (*Dasypus hybridus*) en el que se advierte la vesícula sexual que contiene al bivalente XY. (Según Sáez, Drets y Brum, 1963.) 2 Estadio paquiténico de un ovocito de rata hembra recién nacida. La flecha indica la región de los cromosomas XX. (Cortesía de S. Ohno.)

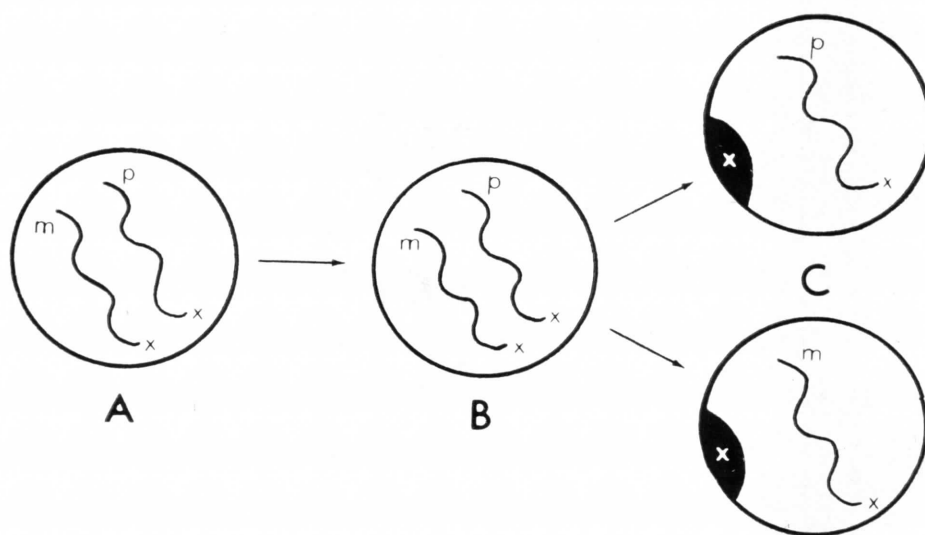


FIG. 15-5. Esquema de la evolución de los cromosomas XX. A En el cigoto tanto el X paterno (p) como el materno (m) son euromáticos. B En el blastocisto temprano se halla lo mismo que en A. C En el blastocisto avanzado el 50 por ciento de las células tienen un X materno heterocromático y el otro 50 por ciento tiene el cromosoma paterno heterocromático.

mento principal con un autosoma. Dicha asociación forma el *neo-X*. En la meiosis, el otro autosoma del par (*AA'*) constituye el cromosoma *neo-Y*, que persiste limitado al sexo masculino. Existen evidencias de que el *neo-Y* se vuelve gradualmente heterocromático. La transformación de eucromatina en heterocromatina es seguida del aislamiento y pérdida de la homología entre aquellas parejas. Esta secuencia de estadios se denomina *gradiente de heterocromatinización*.¹³ Se ha demostrado mediante radioautografía con timidina- H^3 que, como en el caso del cromosoma X, el que se replica tardíamente es el *neo-Y*.¹⁴

Ginandromorfos

Estos organismos constituyen un mosaico de caracteres sexuales masculinos y femeninos con cromosomas de ambos sexos en diferentes partes del cuerpo. Pueden considerarse como formados por un mosaico genético en el espacio.

Equilibrio genético en la determinación sexual

La determinación sexual es el resultado de un equilibrio genético entre factores de masculinidad y femineidad, que se encuentran presentes al mismo tiempo en cada sexo. Algunas veces, un factor epigenético puede asumir el control de los factores genéticos durante el desarrollo, cambiando así la dirección fenotípica del sexo. Entre los vertebrados se han observado casos de bisexualidad, como la coexistencia de estructuras del sexo funcional junto con vestigios del sexo opuesto. Por ejemplo, los machos de los anfibios poseen un ovario rudimentario (órgano de Bidder), así como oviductos vestigiales.

Herencia ligada al sexo

La herencia ligada al sexo corresponde a aquellos genes que se hallan en los cromosomas sexuales, aparte de los que intervienen en la determinación sexual. El siguiente es un ejemplo de este tipo de herencia. En la *Drosophila*, cuando se cruza una hembra homocigótica de ojos rojos (dominante) con un macho de ojos blancos (recesivo), toda la F_1 dará individuos de ojos rojos (fig. 15-9, 1) pero los resultados son muy distintos cuando se cruza una hembra de ojos blancos con un macho de ojos rojos; los hijos machos son de ojos blancos (fig. 15-9, 2). Cruzando hembras heterocigóticas de ojos rojos con machos de ojos rojos se encontró que ambos caracteres se segregaban en la proporción 1:1, en vez de 3:1. Estos experimentos demuestran que el gene se encuentra en el cromosoma X, pero no en el Y.

En los organismos con un tipo XY de determinación del sexo, los genes se pueden presentar en segmentos diferenciales de los cromosomas X e Y (fig. 14-6). Dichos genes no poseen alelos, desde el momento que se encuentran en secciones no homólogas del cromosoma. Están completamente ligados (*linked*) y el *crossing-over* no puede producirse. Hay tres tipos de herencia ligada al sexo: 1) ge-

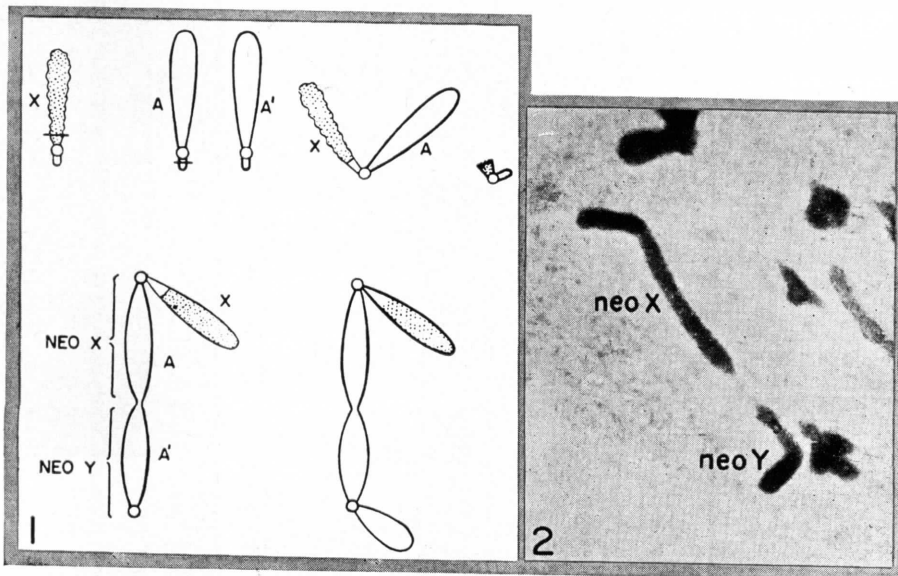


FIG. 15-6. 1 Mecanismo de fusión céntrica entre un miembro A de un par de autosomas *AA'* y el cromosoma sexual X. Se pierde el pequeño fragmento con centrómero, a la derecha. Abajo: a la izquierda, los cromosomas *neo-X* y *neo-Y* en la metafase I. Derecha: el mismo elemento mostrando el *neo-Y* con el centrómero submediano. 2 Cromosomas *neo-X* y *neo-Y* durante la primera metafase meiótica en *Aleuas lineatus*. (Según Sáez.)

nes ligados al cromosoma X, es decir, localizados en la sección no homóloga del X y que por tanto no tiene alelos correspondientes en el Y; 2) genes ligados al cromosoma Y, o sea, localizados en la sección no homóloga del Y, que no tiene alelos correspondientes en el X, y 3) genes localizados en un segmento cromosómico, que es homólogo en los cromosomas X e Y. Este es el ligamento o "linkage" incompleto (véase más adelante).

Genes ligados al cromosoma X

El ejemplo clásico es el del color de los ojos en la *Drosophila*, ya explicado más arriba. En el hombre existen genes que determinan el *daltonismo* (ceguera para el rojo-verde) y

la *hemofilia*. Alrededor del 8 por ciento de todos los hombres blancos padecen de daltonismo, mientras que sólo alrededor del 0,5 por ciento de las mujeres blancas *están afectadas*. En el último caso, ambos cromosomas X se hallan alterados en el mismo *locus*. La hemofilia (un defecto en la coagulación) se hereda como carácter recesivo ligado al sexo. Las mujeres experimentan la enfermedad excepcionalmente, cuando reciben un gene del padre afectado y otro de la madre, heterocigótica. Los varones enfermos rara vez dan descendencia y es muy poco común la procreación en una mujer homocigótica.

Otros genes producen importantes enfermedades en el hombre: ictiosis, miopía, atrofia muscular de Gowers y un tipo de ceguera

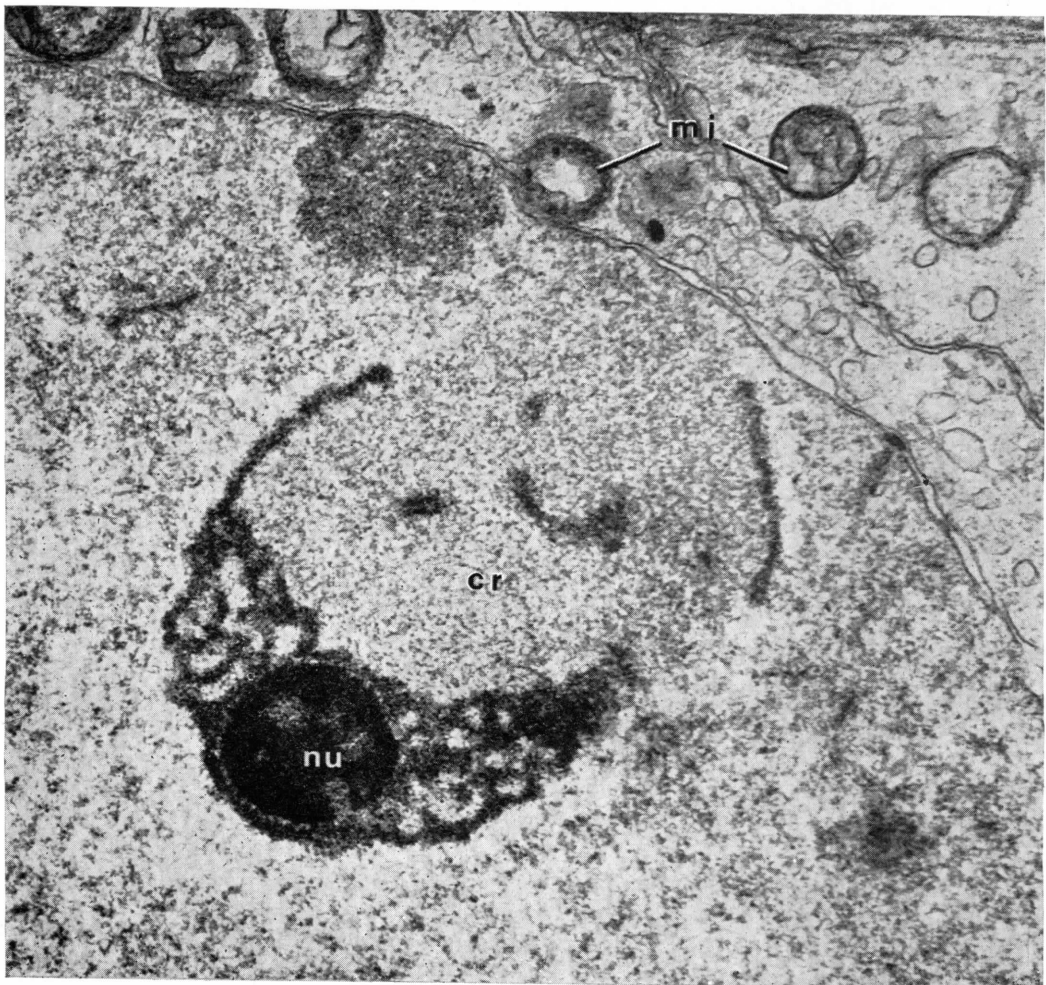


FIG. 15-7. Fotomicrografía electrónica de vesícula sexual de ratón. Se advierte la zona nucleolar en forma de media luna, el nucléolo en su interior, y en la porción cromatinica de la vesícula (cr). (Cortesía de A. J. Solari y L. Tres.)

para el color. Todas estas anomalías se transmiten de la misma manera que el carácter "ojos blancos" en la *Drosophila*, y el estudiante podrá seguir idéntico razonamiento para obtener la F_1 o la F_2 .

Genes ligados al cromosoma Y

Los genes que se localizan en la región no homóloga del Y pasarán directamente del padre al hijo.

Por ejemplo, la *ictiosis hystrix* y otras enfermedades causadas por genes holándricos siguen la línea masculina (fig. 14-6).

Genes localizados en segmentos cromosómicos homólogos de los cromosomas X e Y

Estos genes se heredan del mismo modo que los genes autosómicos. Poseen *caracteres parcialmente ligados al sexo*. En el ser humano se han encontrado 8 defectos de este tipo, entre ellos: la ceguera total para el color, dos anomalías de la piel (*xeroderma pigmentosum* y *epidermolisis bullosa*), la retinitis pigmentaria, la paraplejía espasmódica y otras enfermedades (fig. 14-6).

CITOGENÉTICA HUMANA

En los últimos años, los progresos realizados en Citología y Genética han abierto nuevas perspectivas de notables consecuencias biológicas y médicas. Estos adelantos provienen de técnicas más refinadas en el estudio de los cromosomas, que han permitido una investigación detallada del cariotipo humano, tanto en condiciones normales como patológicas. Estas técnicas, ya descritas en el capítulo 7, incluyen el cultivo de leucocitos, médula ósea, fibroblastos y otros tejidos.

La individualización de los distintos pares de cromosomas homólogos humanos se logró sobre la base de la morfología, tamaño relativo, grado de concentración de la cromatina (heteropícnosis), presencia de constricciones secundarias y satélites, y otras características estructurales (véase cap. 3).

Cariotipo humano normal

En 1912, Winiwater^{15, 16} contó en el varón 47 cromosomas (46 autosomas + X) y en la mujer 48 (46 + XX). En 1923, con material procedente de individuos negros y blancos, Painter¹⁷ encontró 48 cromosomas y el tipo

sexual XX y XY. Hasta 1956, las investigaciones indicaban que el cariotipo normal era de 48 cromosomas. Pero en ese año, con el progreso de las técnicas de cultivo y el empleo de soluciones hipotónicas previamente a los extendidos, se puso de manifiesto que el número normal era de 46 (44 + XX en la mujer y 44 + XY en el varón)^{18, 20} (figura 15-10).

En el cariotipo, los 22 pares de autosomas se numeran en orden decreciente de longitud y son clasificados además por la posición del centrómero en metacéntricos, submetacéntricos o acrocéntricos.

En 1960, un grupo de especialistas reunidos en Denver (Colorado) adoptó una clasificación y ordenamiento de los cromosomas, el cual coincidía con la propuesta por Patau.²¹ De acuerdo con la *convención de Denver*, los 22 pares de autosomas se clasifican en 7 grupos como sigue: el grupo I, comprende los pares metacéntricos del 1 al 3; el grupo II, los pares 4-5, que son submetacéntricos; el grupo

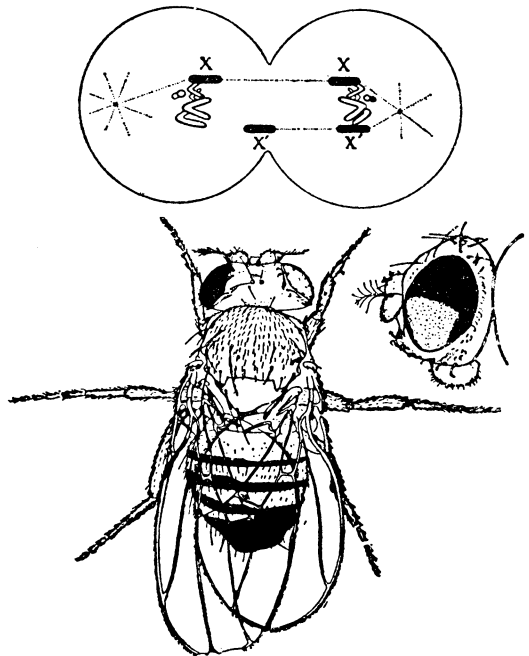


FIG. 15-8. *Ginandromorfo de Drosophila*. Arriba: Primera división de segmentación del huevo en la que se produce la eliminación de un cromosoma X. Abajo: Individuo ginandromorfo resultante, cuyo lado izquierdo es hembra (XX) y el lado derecho es macho (XO). A la derecha, cabeza de una mosca cuyo cromosoma X ha sido eliminado en una de las últimas mitosis somáticas; en el ojo existe una mancha de color rojo. (Según Morgan, Bridges y Sturtevant: tomado de Waddington, 1939.)

po III, los submetacéntricos del 6 al 12; el grupo IV, los pares 13-15, acrocéntricos; el V, el grupo de pares 16-18, submetacéntricos; el VI, los pares 19-20, aproximadamente metacéntricos, y el grupo VII, los pares 21-22, que son acrocéntricos (fig. 15-11). Se han reconocido características especiales en los pares 13, 14, 15 y 21, que tienen un satélite prominente en el brazo corto. En las hembras, el par 22 posee satélites (fig. 15-11).

Anormalidades del cariotipo humano

El estudio de los cariotipos humanos anormales comenzó en 1959, y desde entonces se observaron numerosos tipos relacionados con diferentes enfermedades o síndromes clínicos. Las desviaciones del cariotipo normal se comprobaban en autosomas, en cromosomas sexuales o en ambas clases de cromosomas. Por lo general son del tipo de la aneuploidía, como la monosomía o la trisomía. También se han registrado alteraciones estructurales más complejas como traslocaciones, deficiencias, duplicaciones, etcétera (véase cap. 14).

En la producción de cariotipos anormales intervienen diferentes mecanismos. Uno frecuente, que puede dar lugar a distintas formas de aneuploidía, es el de la *no disyunción*.

La *mitosis no disyuntiva* suele ocurrir en la división mitótica que precede a la formación de células goniales, o en las células que provienen de la división del cigoto. En el primer caso, los efectos son similares a los que se producen en la meiosis no disyuntiva, pero en el segundo —como las alteraciones tienen lugar en los primeros estadios del desarrollo embrionario— pueden originar un *mosaico* de líneas celulares diferentes.

La causa inmediata de la no disyunción es el movimiento retardado de una de las cromátidas hermanas en la anafase, que en la telofase permanece en una de las células hijas junto con la otra cromátida hermana (figura 15-12). Este cambio proporciona una línea celular que carece de un cromosoma o que tiene un cromosoma de más en el par respectivo (monosomía y trisomía).

La *meiosis no disyuntiva*, en la cual el par

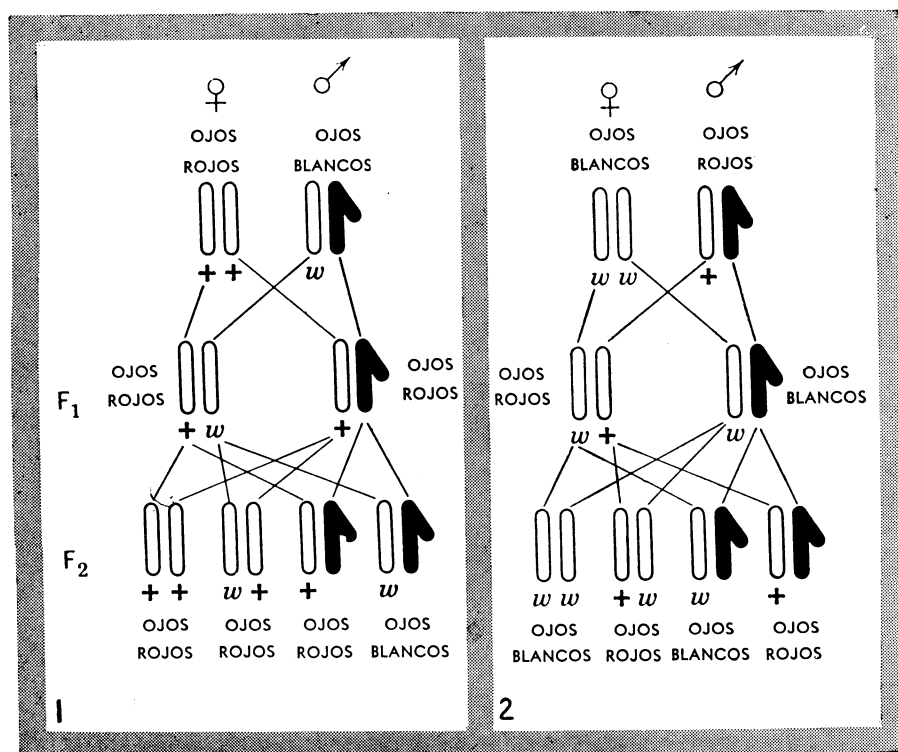


FIG. 15-9. Herencia ligada al sexo para el color de los ojos en la *Drosophila*. Cruzamiento recíproco de: 1 Hembra tipo salvaje, ojos rojos, con macho ojos blancos. 2 Hembra ojos blancos con macho tipo salvaje, ojos rojos. (Véase la descripción en el texto.) (De Morgan, Sturtevant, Muller y Bridges, 1919.)

de cromosomas homólogos falla en su separación, puede producir un óvulo aneuploide que, cuando es fecundado por medio de un espermatozoide normal, forma un cigoto con una anormalidad cromosómica. En algunos casos, los gametos anormales de ambos padres pueden fecundarse, ocasionando tipos más complejos de aberraciones.

Aberraciones cromosómicas en la especie humana

Como se mencionará en el capítulo 19, la mayor parte de las enfermedades genéticas humanas son debidas a alteraciones en la molécula de ADN; en cambio, en las *aberraciones cromosómicas* (o genómicas) del hombre, el mensaje genético contenido en el cromosoma se mantiene intacto.

La alteración es cuantitativa; reside en un desequilibrio por exceso (trisomía) o por defecto (monosomía) en la cantidad de material genético. Ello puede ser perjudicial para el organismo y redundar en variadas alteraciones morfológicas o funcionales. Se verá más adelante que la trisomía produce cambios característicos para cada par presente en exceso. Un factor común en todos estos casos

es la tendencia a la involución del sistema nervioso, coexistente con defectos psíquicos de diversa magnitud. Otra consecuencia importante del exceso de cromosomas es la propensión al aborto espontáneo. En gran número de fetos abortados se comprueba trisomía de uno de los cromosomas grandes del cariotipo.

Aberraciones autosómicas

Trisomía del par 21. (Mongolismo.) Entre las aberraciones autosómicas más importantes se encuentra el *mongolismo* o síndrome de Down, en el que hay un profundo defecto del desarrollo en el sistema nervioso central y retardo mental. En gemelos univitelinos generalmente ambos individuos están afectados, pero en gemelos bivitelinos sólo uno padece la enfermedad. Esto prueba su origen en los gametos.

En 1959 se descubrió que los pacientes tenían un cromosoma extra: existen tres cromosomas del par 21 (trisomía), en vez de los dos normales. Esta trisomía proviene de una meiosis no disyuntiva del cromosoma 21. En pocos casos, el cromosoma extra se encuentra adherido a otros autosomas (traslocación).²²

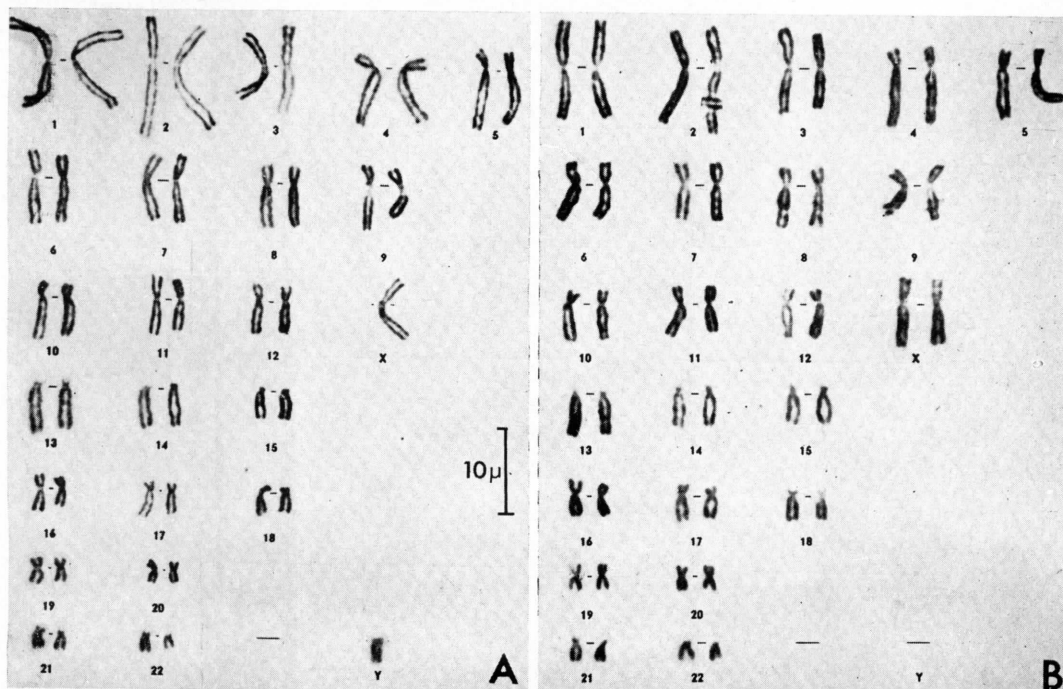


FIG. 15-10. *Cariotipos humanos normales de cultivo de sangre. A Femenino. B Masculino. (Cortesía de M. Drets.)*

El mongolismo es la más común de las enfermedades congénitas y se halla en el 0.1 por ciento de los nacimientos. Su frecuencia aumenta cuando la edad de las madres pasa de los 35 años. La aparición de esta trisomía es un hecho ocasional y casi nunca se observan recurrencias en la familia. Sin embargo, en los casos más raros de mongolismo por traslocación, la enfermedad puede afectar a otros miembros (hermanos y hermanas) y manifestarse en generaciones sucesivas. Afortunadamente, la "trisomía por traslocación" representa sólo del 3 al 4 por ciento del total de mongolismo. Cabe destacar que su frecuencia no experimenta modificaciones con respecto a la edad de la madre, y cuando es correctamente diagnosticada mediante el análisis del cariotipo, se deberá prevenir a los padres sobre su posible repetición. Desde el

punto de vista morfológico, el mongolismo se caracteriza por el aspecto del rostro en luna llena, el aumento de la separación de los ojos, el achatamiento de la raíz nasal, la pequeñez y descenso de las orejas y la hipotonía muscular.

Monosomía del 21. La pérdida de uno de los cromosomas 21 es aparentemente letal, pero existe un síndrome en el que falta sólo parte de un cromosoma del par. El aspecto de estos niños se opone al observado en el mongolismo: la nariz es prominente, la distancia entre los ojos menor que la normal, las orejas más grandes y existe hipertoniya muscular. Parecería entonces que en la trisomía y monosomía del par 21 el fenotipo hubiese cambiado en dirección opuesta con respecto a la normalidad.²²

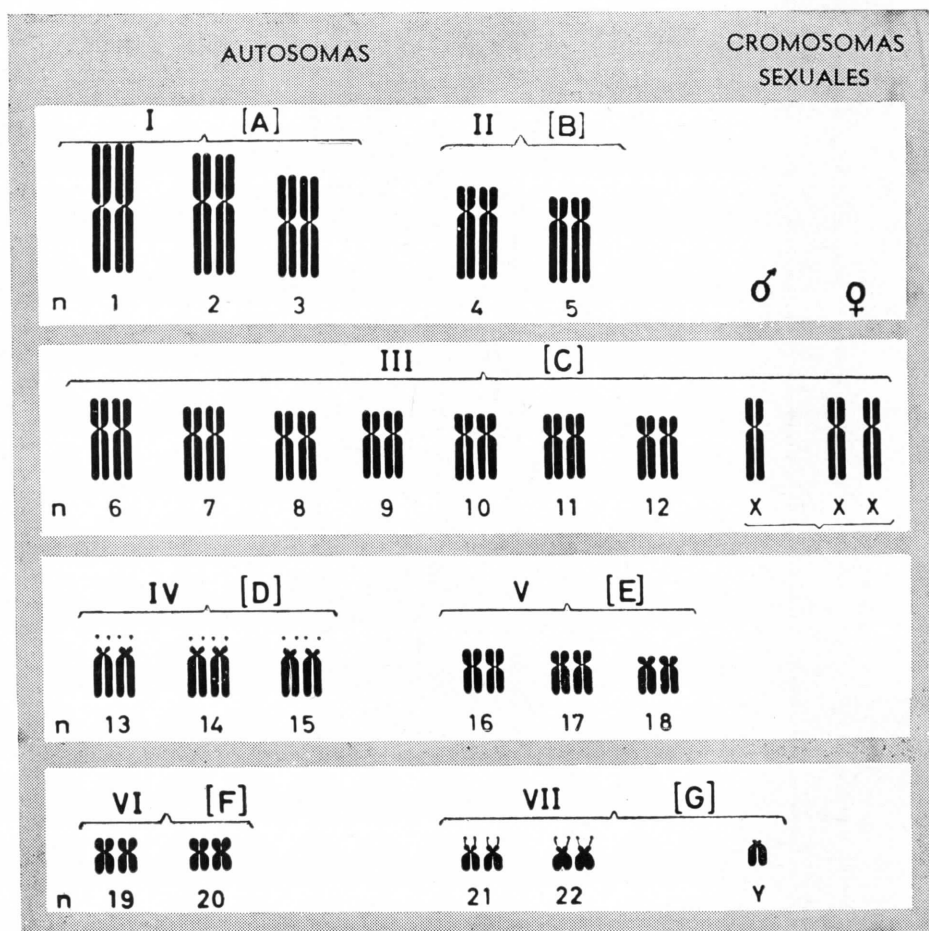


FIG. 15-11. Idiograma de cromosomas humanos, de acuerdo con la clasificación y nomenclatura de Denver.

Trisomía del 18. En este caso, el niño es pequeño y débil, su cabeza se halla achatada lateralmente y el hélix auricular está poco desarrollado. Las manos son cortas y presentan escaso desarrollo de la segunda falange; las impresiones digitales son sumamente simples. Existe evidente retraso mental y por lo común muere antes del año de edad.

Monosomía del 18. En este síndrome, contrariamente al anterior, se produce la pérdida parcial del cromosoma 18.²³ Se manifiesta por orejas prominentes, dedos largos e impresiones digitales complejas.

Trisomía y monosomía del 5. La pérdida parcial del cromosoma 5 se observa en pacientes microcefálicos, con separación acentuada de los ojos y voz característica, de la que deriva el nombre de *grito de gato* con que se conoce al síndrome. En la *trisomía del 5*, el síndrome es opuesto al precedente.²⁴

Otras trisomías. Cuando los pares 13 a 15 son trisómicos se aprecian diversas malformaciones del paladar, ojos, labios, dedos, etcé-

tera. También existen anomalías del tabique interventricular y defectos mentales.

Aberraciones de los cromosomas sexuales

Estas alteraciones difieren de las encontradas en los autosomas, debido a que los cromosomas X e Y poseen una composición genética distinta. Además, como ya se mencionó, existe un mecanismo regulador por el cual los cromosomas X adicionales son, en cierto modo, no funcionantes. Por esta razón, no se observan efectos cuantitativos.

En la tabla 15-1 se citan algunas anomalías de los cromosomas sexuales, junto con los cuadros clínicos correspondientes y el número de corpúsculos de Barr encontrados.

Es probable que el mecanismo de la no disyunción de los cromosomas sexuales ocurra con mucha mayor frecuencia en la madre que en el padre, puesto que para la fecundación se producen millones de espermatozoides y un solo óvulo. Las alteraciones son las siguientes:

TABLA 15-1. Aneuploidías sexuales en el hombre

X/Y	O	Y	YY	Cromatina
X	Monosómico XO Turner $2x - 1$ $2n = 45$	Disómico XY Normal $2x$ $2n = 46$	XYX	0
	Disómico XX Normal $2x$ $2n = 46$	Trisómico XXY Klinefelter $2x + 1$ $2n = 47$	Tetrasómico XXYY Klinefelter $2x + 2$ $2n = 48$	1
	Trisómico XXX Metahembra $2x + 1$ $2n = 47$	Tetrasómico XXXY Tipo Klinefelter $2x + 2$ $2n = 48$		2
XXXX	Tetrasómico XXXX Metahembra $2x + 2$ $2n = 48$	Heptasómico XXXXY Tipo Klinefelter $2x + 3$ $2n = 49$		
Fenotipo	♀	♂	♂	3

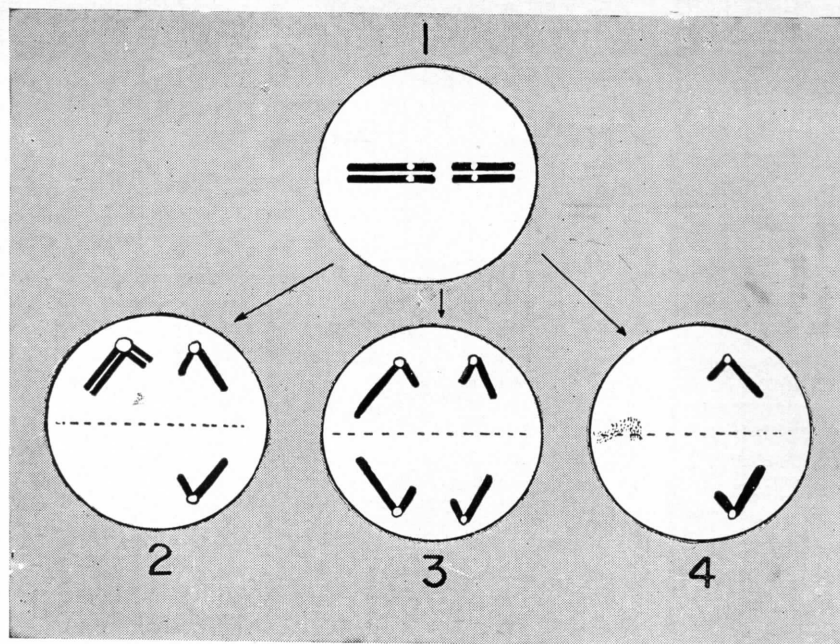


FIG. 15-12. No disyunción mitótica y pérdida cromosómica. 1 metafase normal. 2 Anafase no disyuntiva dando lugar a un núcleo monosómico y otro trisómico. 3 Anafase normal. 4 Pérdida cromosómica que da como resultado dos núcleos monosómicos.

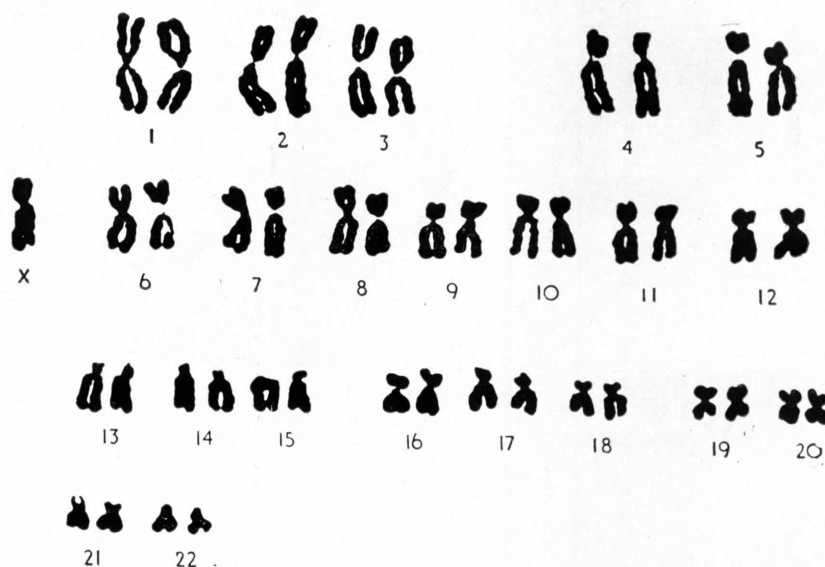
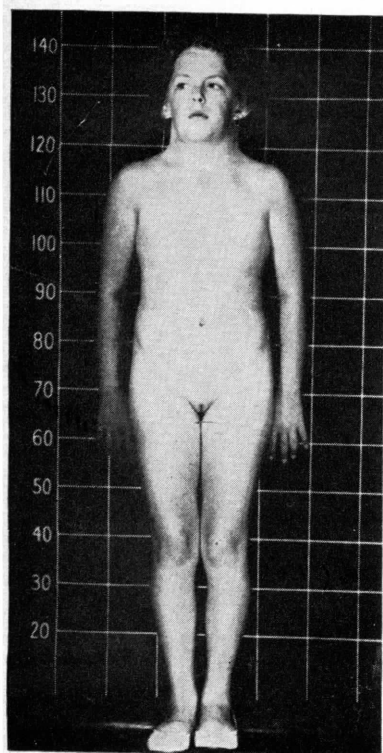


FIG. 15-13. Izquierda. Síndrome de Turner. (Véase descripción en el texto.) (De Novak y Seegar.) Derecha. Idiograma del síndrome de Turner, en el que se registran 44 cromosomas más XO. (De P. E. Polani.)

Síndrome de Turner. (Disgenesia ovárica.) Se trata de pacientes con aspecto somático femenino, de corta estatura, cuello rollizo y generalmente con infantilismo de los caracteres sexuales. Los ovarios y el útero no se desarrollan y los oviductos están atrofiados. No existe menstruación ni caracteres sexuales secundarios. El cariotipo evidencia 45 cromosomas, $44 + X$ y no hay cromatina sexual (figura 15-13).

Síndrome de Klinefelter. Estos pacientes presentan aspecto somático masculino, con falta de espermatogénesis, ginecomastia y testículos pequeños. La mayoría de ellos tienen cromatina sexual positiva y 47 cromosomas: 44 autosomas $+ XXY$.

En los testículos se aprecia abundante cantidad de células de Leydig, pequeños túbulos seminíferos, aplastados y hialinizados, que contienen sólo células de Sertoli.

Varones con múltiples corpúsculos de cromatina sexual. Se han encontrado individuos con deficiencia mental, testículos pequeños y dos corpúsculos de Barr. El cariotipo es de 48 cromosomas: 44 autosómicos $+ XXXY$. En un paciente de 7 años de edad, con alteraciones somáticas semejantes, se hallaron 49 cromosomas: 44 autosomas $+ XXXXY$.

Síndrome XYY. Estos pacientes son generalmente más altos, y aunque no presentan modificaciones morfológicas visibles, tienen cincuenta veces más tendencia a delinquir y a ser agresivos que la presentada por individuos con cariotipo normal. Son muy irresponsables e inmaduros y evidencian un comportamiento antisocial desde temprana edad.^{25, 26}

Superhembras o metahembras. Poseen caracteres sexuales femeninos normales, a no ser por la amenorrea. Tienen el intelecto embotado y no manifiestan anomalías somáticas asociadas. La mucosa bucal presenta dos corpúsculos de cromatina sexual. El número cromosómico es de $47: 44$ autosomas $+ XXX$. En dos casos con grave retardo mental, se comprobó 3 corpúsculos de Barr y 44 autosomas $+ XXXX$, con una acentuación de los caracteres femeninos (por ejemplo, la pelvis extremadamente grande). Este síndrome $4X$ es en cierto modo opuesto al de Turner.

Alteraciones cromosómicas mixtas. Se observaron en pacientes con síndrome de Klinefelter combinado con mongolismo. Poseen 48 cromosomas, 45 autosomas,

con trisomía del cromosoma número 21 y una fórmula sexual XXY .

Influencia de los cromosomas X e Y. En contraste con la *Drosophila*, en el hombre el cromosoma Y es suficiente para producir organismos del sexo masculino, aun en presencia del X. La ausencia del Y en el síndrome de Turner da lugar a mujeres, pero con disgenesia gonadal.

En el género humano, los individuos XXY (síndrome de Klinefelter) y los XO (síndrome de Turner) son estériles, no así en el ratón en el que los individuos XO son hembras fértiles. El cromosoma X en los mamíferos (incluso el hombre) es fuertemente femineizante y es probable que posea genes indispensables para el desarrollo. Hasta ahora no se han encontrado individuos carentes de cromosomas X.

Mosaicos. Algunas veces, las aberraciones cromosómicas sobrevienen durante el desarrollo embrionario. Un caso interesante lo constituye la pérdida de un cromosoma Y en la primera división del cigoto. Esto puede conducir a la formación de mellizos, uno de los cuales es un macho normal y el otro presenta un síndrome de Turner.

También pueden producirse verdaderos hermafroditas o ginandromorfos, con constitución XX o XY comprobable en las células sanguíneas. En los verdaderos hermafroditas es posible hallar un *ovotestis*. En el caso de mosaicos existen clones de células con diferente constitución cromosómica. La tabla 15-2 enumera los mosaicos de los cromosomas sexuales en la especie humana.

Puesto que los mosaicos con constitución YO/XXY , $YO/XY/XXY$ e YO/XY no han sido todavía hallados, parece razonable aceptar que la combinación YO no es viable.

Aneuploidía y cáncer

La aneuploidía constituye un hallazgo frecuente en el cáncer. Esta aberración cromosómica da lugar a una alteración de los mecanismos reguladores de la división celular y a una inestabilidad acentuada de la célula.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Barlow, P. W. (1967) Sex Chromosomes. *Nature*, 216:5118, 892.
 Bartalos, M. and Baranki, T. A.: (1967) *Medical Cytogenetics*. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
 Gallien, L.: (1959) Sex determination. In: *The cell*, vol. 1, p. 399. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.

TABLA 15-2. Mosaicos cromosómicos sexuales

Hembras	Síndrome clínico	Cromatina sexual	Machos	Síndrome clínico	Cromatina sexual
XO/XY	Turner	—	XX/XXY	Klinefelter	+
XO/XX	Turner	—	XY/XXY	Klinefelter	+
XO/XXY	Turner	—	XXXX/XXXXY	Gónadas y caracteres sexuales reducidos, trastornos mentales.	3 +
XO/XXX	Variable	—	XO/XY	Hermafrodita	—

- Gardner, L. I.: (1961) *Molecular genetics and human disease*. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
- German, J.: (1967) Autoradiographic studies of human chromosomes. *Proc. 3rd Congress Human Genetic*, p. 123.
- Gowen, J. W.: (1961) Genetic and cytologic foundations for sex. In: *Sex and internal secretions*. 3rd ed. (Young, W. C., ed.) Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Hamerton, J. L.: (1963) *Chromosomes in Medicine*. Medical Advisory Committee of the National Spastics Society in association with Wm. Heinemann. Little Club Clinics in Developmental Medicine, Nº 5.
- Kerr, W. E.: (1963) Genética da determinação do sexo. In: *Genetica*. (Pavan, C. and Da Cunha, B., eds.) University of São Paulo, Brazil.
- Kihlman, B. A., Nichols, W. W. and Levan, A.: (1963) The effect of deoxyadenosine and cytosine arabinoside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Hereditas*, 50:139.
- Lejeune, J., Gautier, M. and Turpin, R.: (1959) Les chromosomes humaines en culture. *C. R. Acad. Sci.*, 248:602.
- Luning, K. C.: (1963) Studies of irradiated mouse populations. II. Dominant effects on productivity in the 4th-6th generation. *Hereditas*, 50:361.
- Melander, Y.: (1962) Chromosomal behavior during the origin of chromatin in the rabbit. *Hereditas*, 48:646.
- Melander, Y. and Hansen-Melander, E.: (1962) Sex chromosome allocycly in the male rabbit. *Hereditas*, 48:662.
- Mittwoch, U.: (1967) *Sex chromosomes*. Academic Press, New York.
- Mittwoch, U.: (1967) Sex differentiation in mammals. *Nature*, 214:554.
- Ohno, S.: (1965) A philogenetic view of the X chromosome in man. *Ann. Génét.*, 8:3.
- Ohno, S.: (1967) *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Pfeiffer, R. A.: (1966) Inborn autosomal disorders: The phenotype of autosomal aberrations. *Proc. 3rd Congr. Human Genetic*, 1966, p. 103.
- Russell, L. B. (1961) Genetics of mammalian sex chromosomes. *Science*, 133:1795.
- Russell, L. B.: (1964) Another look at the single-active-X hypothesis. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 26:726.
- Sáez, F. A., Drets, M. E. and Brum, N.: (1962) The chromosomes of the mulita (*Desypus hybridus Desmarest*). A mammalian edentata of South America. *Symposium of mammalian tissue culture and cytology*, São Paulo, Brazil.
- Sasaki, M. and Makino, S.: (1965) The meiotic chromosomes of man. *Chromosoma*, 16:637.
- Telfer, M. A. (1968) Incidence of gross chromosomal errors among tall criminal. american males. *Science*, 159:1249.
- Wennstrom, J. and Chapelle, A.: (1963) Elongation as the possible mechanism of origin of large human chromosomes. An autoradiographic study. *Hereditas*, 50:345.
- Westergaard, M.: (1958) The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv. genet.*, 9.
- White, M. J. D.: (1960) Are there mammal species with XO males and if not, why not? *Amer. Naturalist.*, 94:301.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. McClung, C. E.: (1902) *Biol. Bull.*, 3:343.
2. White, M. J. D.: (1954) *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press.
3. White, M. J. D. (1961) *The chromosomes*. 5th ed. Methuen & Co., London.
4. Barr, M. L. and Bertram, E. G.: (1949) *Nature* (London), 163:676.
5. Barr, M. L.: (1955) *Anat. Rec.*, 121:387.
6. Barr, M. L., Bertram, E. G. and Lindsay, H. A.: (1950) *Anat. Rec.*, 107:283.
7. Ohno, S., Kaplan, W. D. and Kinosita, R.: (1959) *Exp. Cell Res.*, 18:415.
8. Russell, L. B.: (1961) *Science*, 133:793.
9. Ohno, S.: (1967) *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer-Verlag, Berlin.
10. Ohno, S., Kaplan, W. and Kinosita, R.: (1957) *Exp. Cell Res.*, 13:358.
11. Solari, A. J. y Tres L. L.: (1967) *Exptl. Cell Res.*, 47:86.
12. Solari, A. J. and Tres, L. L.: (1967) *Chromosoma*, 22:16.
13. Sáez, F. A.: (1963) *Port. Acta Biol.*, Ser. A, 7:11.
14. Díaz, M. O. and Sáez, F. A.: (1968) *Chromosoma*, 24:10.
15. Winiwarter, H.: (1912) *Arch. Biol.*, 5:27.
16. Winiwarter, H. and Oguna, K.: (1930) *Arch. Biol.*, 40:541.
17. Painter, T. S.: (1923) *J. exp. Zool.*, 37:291.
18. Tjio, J. M. and Levan, A.: (1956) *Hereditas*, 42:1.
19. Tjio, J. M. and Puck, T. T.: (1958) *J. exp. Med.*, 108:259.
20. Ford, C. E., Hamerton, J. L. and Mole, R. H.: (1958) *J. cell comp. Physiol.*, 52:235.
21. Patau, K.: (1960) *Amer. J. hum. Genet.*, 12:250.
22. Lejeune, J.: (1964) In: *Progress in Medical Genetics*, 3, p. 144. Grune and Stratton, New York.
23. Grouchy, J., Bonnette, J. and Salmon, Ch.: (1966) *Ann. Génét.*, 9:19.
24. Lejeune, J., Lafourcade, J., Berger, R. and Rethoré, M. O.: (1965) *Ann. Génét.*, 8:11.
25. Jacobs, P. A., Brunton, M., Melville, M., Brittain, R. P. and McClemon, W. F.: (1965) *Nature*, 208:1351.
26. Price, W. W. and Whatmore, P. B.: (1967) *Nature*, 213:815.

SEPTIMA PARTE

BIOLOGIA MOLECULAR

Los cinco capítulos siguientes comprenden los temas principales que se incluyen generalmente con la denominación de Biología molecular. En este campo se han verificado los progresos más notables de los últimos años, sobre los cuales reside el futuro de muchos aspectos de la Biología celular. Esos estudios están íntimamente relacionados con la Genética molecular, que intenta explicar los fenómenos hereditarios como resultantes de la función de componentes químicos específicos localizados o formados en los cromosomas. Se ha demostrado, así, que la información genética es dictada inicialmente por la disposición de las bases del ácido desoxirribonucleico (ADN), que luego es transcrita a las diferentes moléculas de ácido ribonucleico (ARN mensajero, ARN de transferencia y ARN ribosómico) y, finalmente, traducida en diversas proteínas y enzimas específicas. El conocimiento del modelo de Watson-Crick del ADN, presentado en el capítulo 4, y la disposición exacta del apareamiento de bases de dicha molécula, son requisitos previos para abordar esta parte del libro.

El capítulo 16 ofrece una reseña general de los datos recogidos en los últimos años sobre la ultraestructura del núcleo interfásico, así como de los cromosomas y el nucléolo. También se incluye el estudio de la envoltura nuclear con sus propiedades especiales de permeabilidad. El conocimiento de la localización del ADN, ARN y proteínas nucleares, y de la organización macromolecular de los cromosomas con sus microfibrillas elementales y las fibrillas más complejas que componen el modelo de la fibra plegada durante la mitosis y meiosis, son de fundamental importancia para interpretar la duplicación cromosómica. Más notable aún es el hecho de que dentro de un solo cromosoma humano se encuentran varios centímetros de ADN sumamente apretados, y que en el nucléolo reside el mecanismo de la síntesis de los ribosomas.

En el capítulo 17 se estudia el núcleo desde el punto de vista citoquímico, junto con el ADN y los diferentes ARN-s y proteínas nucleares. Un concepto importante es que el contenido de ADN del núcleo suele ser constante para cada especie, aunque existan algunas excepciones a esta regla, particularmente durante ciertos períodos funcionales. El mecanismo molecular de la duplicación del ADN se explicará sobre la base del que tiene lugar en las células bacterianas, demostrándose que en las células superiores el proceso ocurre en un período específico de la interfase, denominado *período sintético* o *fase-S*, que es precedido y seguido de dos intervalos, G_1 y G_2 , en los cuales no se realiza síntesis.

Usando timidina tritiada, que marca específicamente al ADN sintetizado, es posible observar mediante radioautografía la duplicación de un solo cromosoma, que en las bacterias está compuesto por una molécula circular única de ADN. El resultado es extraordinario; durante la duplicación del ADN, el desenrollamiento de las dos cadenas de polinucleótidos, con la correspondiente ruptura de puentes de hidrógeno, debe ocurrir a 10.000 revoluciones por minuto. En células superiores, la síntesis de ADN no ocurre simultáneamente

en todos los cromosomas y, en algunos casos, ciertas partes se duplican temprana o tardíamente en el período S.

El capítulo 19, que trata de la síntesis proteica y la genética molecular, ofrece algunos ejemplos simples, tomados de enfermedades humanas, que indican la manera en que los genes controlan las reacciones bioquímicas y son susceptibles de producir cambios moleculares, de los cuales resultan la falta de ciertas enzimas y la alteración de otras proteínas. El dogma central de la Biología molecular: duplicación del ADN, transcripción en ARN-s y traducción en proteínas, ya desarrollado en capítulos anteriores, se examina en éste desde el punto de vista de la relación entre genes y síntesis proteica. El ARN mensajero y el de transferencia son considerados en su aspecto estructural y en sus propiedades moleculares, incorporándose el concepto de ARN-s mensajeros de larga duración, así como el de informosomas. Estos conocimientos proporcionan las bases necesarias para la comprensión del papel de los ribosomas y polirribosomas en la síntesis proteica. Uno de los hechos más salientes lo constituye la existencia de un ciclo en el que las subunidades ribosómicas se asocian y disocian. Asimismo, se destaca la intervención de factores especiales en la iniciación, alargamiento y terminación de la cadena proteica. El capítulo finaliza aportando algunos detalles acerca de la ultraestructura de los genes y la regulación de la acción génica en células inferiores. En relación con ella, se analiza el papel de los genes reguladores y operadores y del operón.

El capítulo 20 abarca los problemas fundamentales de la diferenciación e interacción celulares. Este capítulo adquiere importancia especial en Biología celular, puesto que en él se exponen los fundamentos recientes sobre la regulación de la acción génica en células superiores. La descripción de experimentos de control nuclear ejercido por el citoplasma demuestra la influencia de este último sobre el núcleo e ilustra, además, las continuas interrelaciones existentes entre los dos territorios celulares principales. Una de las nociones más interesantes es que en las células superiores gran parte del genomio es redundante; o sea, no funciona transcribiendo su información en determinados momentos de su ciclo vital. Se menciona la posible intervención de las histonas, las proteínas ácidas y el ARN en la regulación de la función de los genes, y se ofrecen ejemplos de este mecanismo en cromosomas politénicos. Los temas precedentes están también vinculados con los de la diferenciación, crecimiento, renovación y envejecimiento celular. El ciclo vital de los diferentes tipos celulares que constituyen un organismo superior es asimismo de considerable interés teórico y práctico, y se halla en conexión con el estudio de las células embrionarias y cancerosas. Estas experiencias son valiosas como introducción al conocimiento de los diferentes tejidos, en cada uno de los cuales se aprecia también un ciclo diferente de división y diferenciación.

Finalmente, se introducen los nuevos conceptos de interacción y comunicación celular, el acoplamiento eléctrico entre células y la importante noción de la inhibición de contacto.

Ultraestructura del núcleo y de los cromosomas. El nucléolo

La descripción del núcleo interfásico y de los cromosomas efectuada en los capítulos precedentes, estaba basada en el examen con el microscopio óptico. En los cromosomas se destacaron importantes detalles morfológicos (cromómeros, centrómeros, satélites, organizador nucleolar, etc.) que permiten su identificación dentro del cariotipo. Se reconoció también que la mayor parte del cromosoma está compuesta por un filamento, el *cromonema*, que experimenta un complejo ciclo de enrollamiento durante la mitosis y la meiosis. El núcleo interfásico contiene asimismo al *nucléolo*, constituido por ribonucleoproteínas, y se halla en esta etapa rodeado de la *membrana nuclear*.

En la actualidad, se acepta que el gene representa una porción de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), y que el material genético puede ser dividido hasta su última estructura molecular (véanse caps. 17 y 19). Por esa razón el estudio de la ultraestructura y de la disposición molecular de las nucleoproteínas en el núcleo y cromosomas es de particular importancia para interpretar sus funciones genéticas. De alguna manera, este capítulo se encuentra estrechamente relacionado con los aspectos químicos de la biología molecular del núcleo y con la genética molecular, expuestos anteriormente.

Envoltura nuclear y permeabilidad del núcleo

Como se mencionó en el capítulo 2, es poco lo que la microscopia óptica puede aportar acerca de la membrana nuclear, actualmente denominada *envoltura nuclear*. Se ha establecido que los núcleos aislados presentan propiedades osmóticas,¹ y que la punción del núcleo provoca su rápida lisis. Esto no

sucede en el caso de la membrana plasmática, que tiende a repararse en presencia de Ca^{++} . Es posible probar que la envoltura nuclear representa una verdadera barrera inyectando una proteína marcada con fluoresceína, la cual no penetra en el núcleo.²

Una de las contribuciones más interesantes de la microscopia electrónica con respecto a este problema es que la *membrana* o *envoltura nuclear* constituye una dependencia del sistema vacuolar citoplásmico. Ello ha sido demostrado, no sólo observando la continuidad de estas dos estructuras en diversos puntos, sino también comparándolas en distintos estadios de actividad celular y haciendo su estudio filogenético. Por ejemplo, la mayor parte de las bacterias carecen de membranas internas y su nucleoide no posee envoltura; las micobacterias tienen unas pocas membranas citoplásmicas pero ninguna alrededor del núcleo.³ La envoltura nuclear sólo aparece como estructura definida en hongos y en células de organismos superiores.⁴

Probablemente, una de las demostraciones más claras de que la envoltura nuclear deriva del retículo endoplásmico se produce en la mitosis. En la telofase, las cisternas del retículo endoplásmico se disponen alrededor de los cromosomas para reformar la envoltura nuclear.⁵

Poros nucleares y estructuras anulares

Los primeros estudios del núcleo con el microscopio electrónico se llevaron a cabo en membranas nucleares aisladas de ovocitos de anfibios, reconociéndose una capa externa porosa y otra interna continua.⁶ Los poros medían alrededor de 400 Å de diámetro, es-

taban distribuidos en forma regular y la distancia entre ellos era de 1000 Å.

Los adelantos registrados en las técnicas de ultramicrotomía permitieron establecer que la envoltura nuclear se halla compuesta por dos capas membranosas concéntricas, separadas por un espacio de 100 a 150 Å, que toman contacto en los poros. Se interpretó a esta envoltura como cisternas aplanadas del retículo endoplásmico que poseían ribosomas, únicamente en su superficie externa.^{7, 11} Algunas veces, por dentro de la membrana interna, puede observarse una capa fibrosa.¹² Como evidencia la figura 16-1, en relación con los poros nucleares se hallan canales intercromatínicos claros. El número de poros varía según las especies y los tipos celulares. En ovocitos de erizo de mar se

contaron entre 40 y 80 poros por μ^2 . En la ameba existe un sistema de prismas hexagonales vinculados con los poros.¹³ En núcleos de mamíferos se calcula que el 10 por ciento de la superficie corresponde a ellos y el resto a las membranas del retículo endoplásmico.¹¹ Varios autores verificaron que los poros están rodeados de formaciones circulares, denominadas *estructuras anulares*. Los poros, junto con dichas estructuras, forman los *complejos del poro*, que se disponen de modo hexagonal sobre la superficie de la envoltura nuclear (fig. 10-6).

El uso de tinción negativa (véase cap. 6), puso de manifiesto que los poros nucleares presentan forma octogonal y ha permitido además determinar con mayor precisión su tamaño, siendo éste de unos 660 Å. También

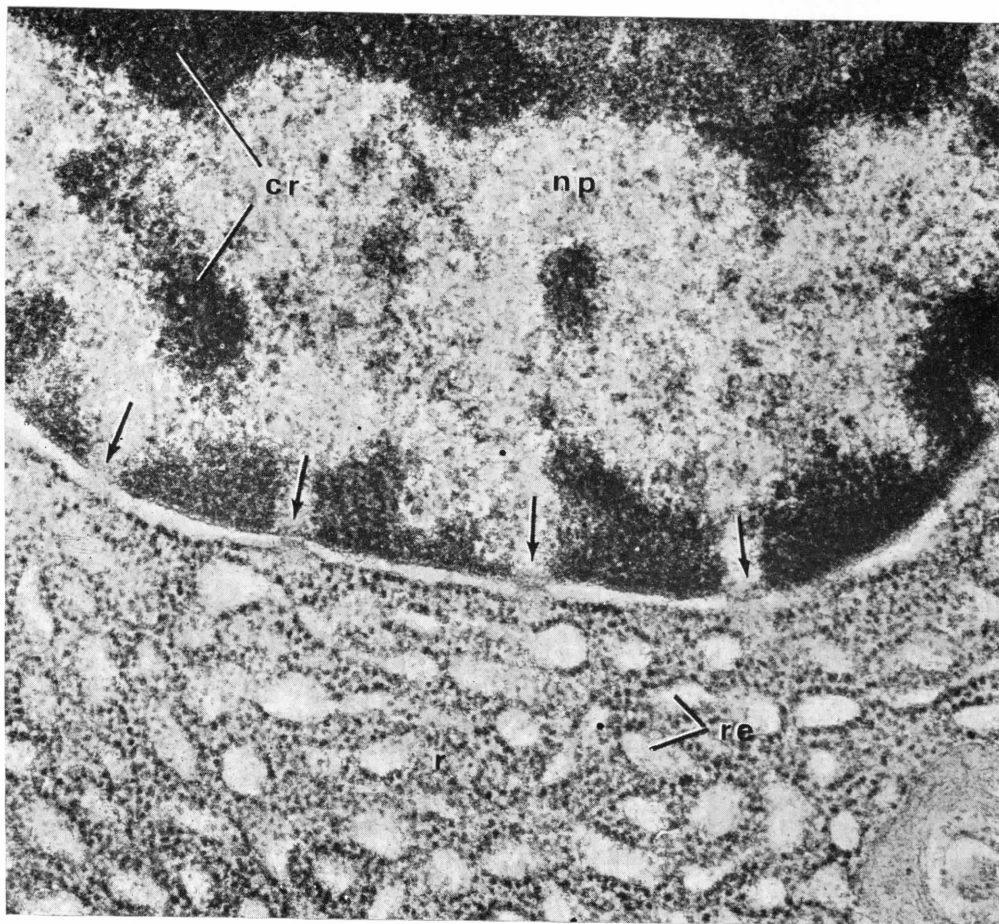


FIG. 16-1. Fotomicrografía electrónica de una parte del núcleo y del citoplasma de la célula pancreática del ratón. Con flechas se indican los poros en la envoltura nuclear, los cuales están situados a nivel de los canales intercromatínicos. *cr*, Cromatina; *re*, retículo endoplásmico; *np*, nucleoplasma; *r*, ribosomas. 48,000 $\times$. (Cortesía de J. André.)

se demostró que las estructuras anulares son agregados que pueden ser desprendidos de la superficie externa del poro. Tienen un diámetro externo de alrededor de 1200 Å y un orificio interno de tamaño variable: entre 0 y 400 Å (fig. 16-2).¹⁴

Este y otros trabajos evidencian que los poros nucleares no son orificios de comunicación libre. En células hepáticas la abertura central de las estructuras anulares es de sólo 100 Å. Podrían constituir entonces una especie de diafragma que cubre parte del poro nuclear,⁸ y el complejo del poro, a su vez, representar estructuras especiales para la permeabilidad selectiva y no simplemente orificios. Diversos autores observaron material de alta densidad electrónica, probablemente partículas ribonucleoproteicas, pasando a través del centro del complejo del poro.¹⁵ Estos hallazgos están relacionados con el problema de las interrelaciones nucleocitoplásmicas (véase cap. 20).

Permeabilidad de la envoltura nuclear

Distintos experimentos tienden a probar que el complejo del poro puede ser una abertura temporal o permanente de la envoltura nuclear. Inyectando en el citoplasma de amebas partículas de oro coloidal cuyo tamaño varía entre 25 y 170 Å, se descubrió que las partículas de hasta 85 Å penetraban rápidamente, las de 89 a 106 Å también penetraban, aunque con más lentitud, mientras que las de mayor tamaño no lo hacían. Estos resultados indican que las aberturas son más pequeñas que el diámetro del poro.¹⁶ Con dicha técnica se obtuvieron datos que sugieren que los poros sirven para el pasaje de macromoléculas. Las estructuras anulares actuarían regulando el intercambio de aquéllas, probablemente en función de su tamaño y naturaleza química. Es importante destacar que la permeabilidad de la envoltura nuclear no es estática sino que varía conforme al tipo celular e, incluso, en una misma célula, por lo menos durante su división. Podrían atribuirse esas variaciones a cambios en la naturaleza del material anular (Feldher, 1969).

Potenciales a nivel de la envoltura nuclear

La presencia de poros puede ser correlacionada con algunas de las propiedades electro-

químicas de la membrana nuclear. Empleando finos microelectrodos (fig. 16-3),¹⁷ se han reconocido dos tipos de membrana nuclear. Cuando el microelectrodo se introduce en una célula gigante de la glándula salival de la *Drosophila*, hay un cambio brusco en el potencial de la membrana plasmática (-12 mV); luego, cuando aquél penetra en el núcleo existe una nueva caída en el potencial negativo de la membrana nuclear (-13 mV). Los resultados sugieren que ésta debe ser una barrera de difusión aun para iones tan pequeños como el K^+ , Na^+ o Cl^- . Sin embargo, en el otro tipo de membrana nuclear, presente en los ovocitos, no se registra ningún potencial, lo cual indica un intercambio libre de iones entre el núcleo y el citoplasma.¹⁸

Ultraestructura del núcleo interfásico

Distintos problemas técnicos dificultaban el estudio de la ultraestructura del núcleo en las células superiores. En primer término, la compleja disposición tridimensional de los constituyentes nucleoproteicos no permitía interpretar fácilmente su estructura en cortes delgados. Otro inconveniente lo constituía el hecho de que los ácidos nucleicos no se ligan al tetróxido de osmio, generalmente usado en la fijación.¹⁹

La introducción del Ca^{++} en las mezclas fijadoras mejoró el grado de preservación e hizo posible reconocer la estructura microfibrilar de los cromosomas.²⁰ Se obtuvieron

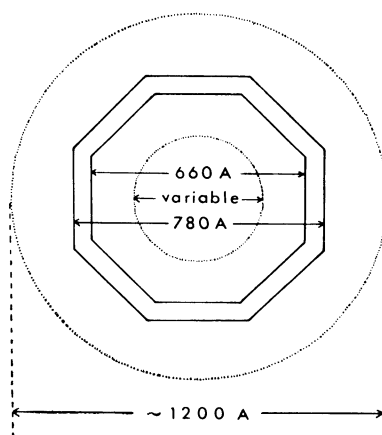


FIG. 16-2. Esquema que pone de manifiesto las dimensiones de un poro nuclear octogonal y del anillo asociado (en punteado). (Cortesía de J. G. Gall.)

mejoras en el contraste utilizando cationes metálicos como el indio y el bismuto,^{21, 22} y el acetato de uranilo. Este último tiene una afinidad 800 veces superior con los ácidos nucleicos que con las proteínas.²³ Otro aporte fue la digestión mediante enzimas específicas después de la inclusión en medios hidrosolubles.²⁴ Más recientemente, el uso de iones uranilo y la aplicación de ciertos métodos extractivos permitieron diferenciar en el núcleo interfásico las regiones ricas en ADN de aquellas en las que abunda el ácido ribonucleico (ARN).

En la figura 16-4 se observa la típica imagen de un núcleo coloreado con acetato de uranilo. Ambos ácidos nucleicos están intensamente teñidos, pero predomina el ADN. Se aprecia asimismo la disposición de la cromatina en grumos cerca de la envoltura nuclear, con canales intercromatínicos que conducen a los poros nucleares. La masa del nucléolo es menos densa y está rodeada de cromatina con mayor densidad electrónica. El nucleoplasma es claro y muestra algunos gránulos finos.

Localización de ribonucleoproteínas nucleares

En la figura 16-5 se ha tratado al núcleo, después de colorearlo, con el agente quelante EDTA, que extrae los iones uranilo del ADN y permite destacar las regiones nucleares ricas en ARN, así como los ribosomas citoplásmicos. Este método, complementado con otros de digestión enzimática, extracción selectiva y experimentos con drogas o shocks de temperatura supraóptima —que interfieren con la síntesis o degradación del ARN—, hicieron factible la localización ultraestructural de las ribonucleoproteínas (RNP) en el núcleo.^{25, 26} Además de las RNP fibrilar y granular que se encuentran en el nucléolo (véase más adelante), en el nucleoplasma se distinguen: a) *fibrillas de RNP intercromatínicas*, situadas cerca de la cromatina; b) *gránulos de RNP intercromatínicos* de unos 250 Å con la misma localización; c) *gránulos de RNP pericromatínicos* de alrededor de 450 Å, y d) *cuerpos de RNP más grandes y*

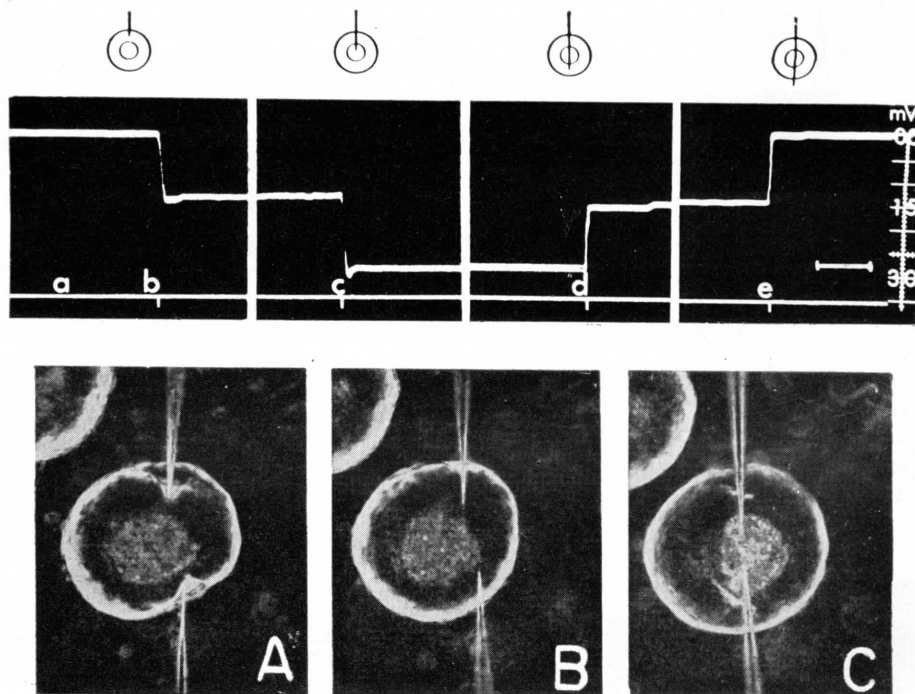


FIG. 16-3. Experimento de microcirugía para estudiar en núcleos gigantes de la glándula salival el potencial de la membrana nuclear de la *Drosophila*. Arriba, Esquema de la penetración del microelectrodo en la célula y los potenciales de membrana registrados en cada posición. Abajo, Fotomicrografías de células en las que han penetrado dos microelectrodos; A, al comienzo; B, en el citoplasma; C, dentro del núcleo. (Cortesía de W. R. Loewenstein y Y. Kanno.)

en ovillo (fig. 16-6). En el capítulo 17 se incluye una posible interpretación del significado de estas estructuras que poseen RNP. Aparte de los cuatro tipos comunes de par-

tículas de RNP existen: e) *gránulos de 300 a 400 Å* en los ovocitos de anfibios, de origen nucleolar, y f) *hélices de 300 a 800 Å* por 700 mμ de longitud en núcleos de ameba.

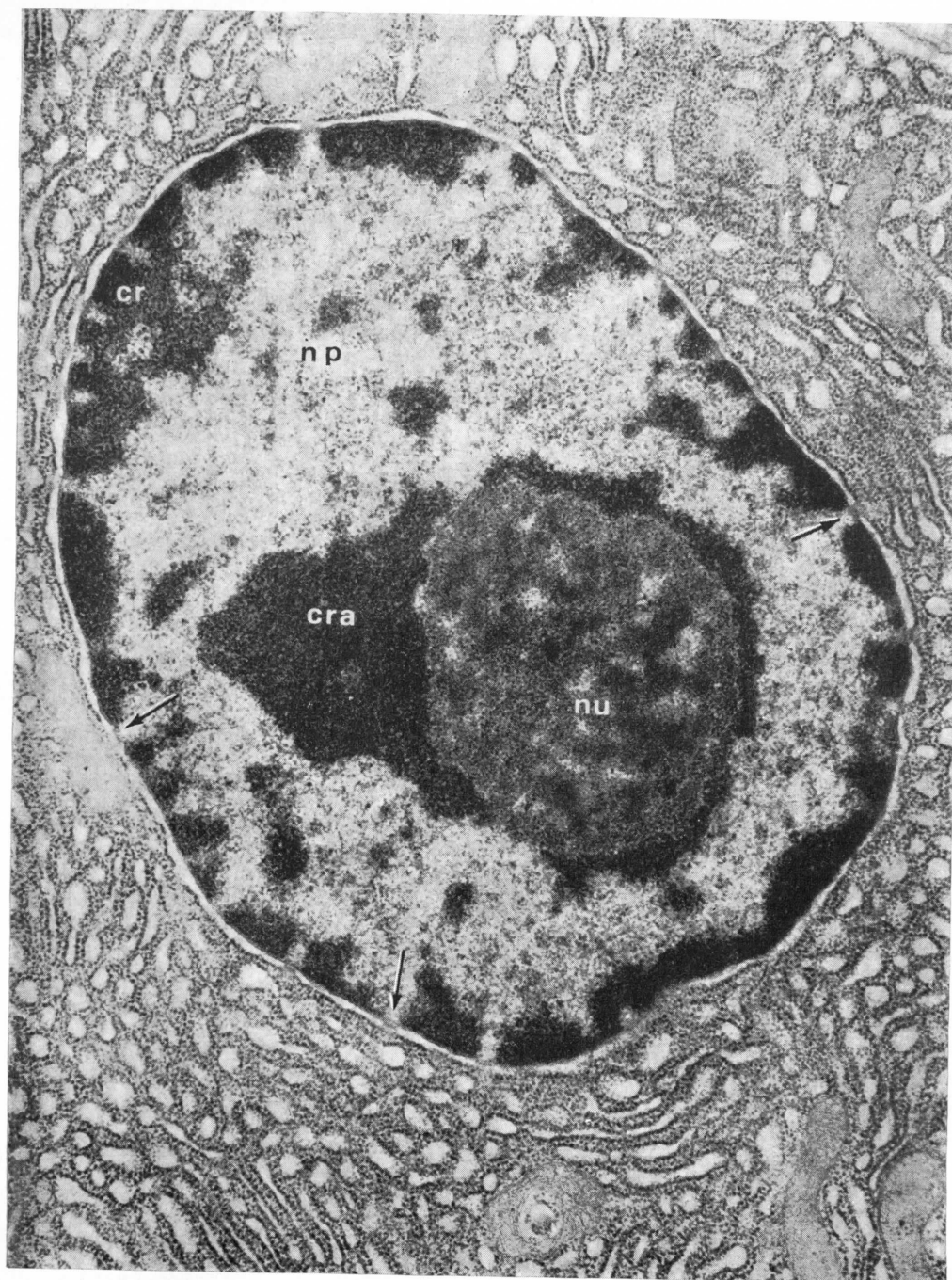


FIG. 16-4. Fotomicrografía electrónica del núcleo de una célula pancreática de ratón. La coloración con acetato de uranilo destaca las regiones que contienen ADN. Con flechas se indican los canales intercromáticos que apuntan a los poros nucleares, *cra* Cromatina asociada al nucléolo (*nu*); *np*, nucleoplasma, 24,000 $\times$. (Cortesía de J. André.)

Organización macromolecular de las desoxirribonucleoproteínas

El comportamiento de los cromosomas durante la mitosis y meiosis, así como la disposición lineal y ordenada de los genes, implica la existencia de una organización muy precisa.

Esa disposición es fácilmente demostrable en procariontes, como virus y bacterias. Conforme se explicó en el capítulo 1, la *Escherichia coli* contiene uno o dos cromosomas formados por ADN circular de 1 mm de longitud (fig. 1-3). En las células superiores el contenido de ADN es mucho mayor y representa una longitud

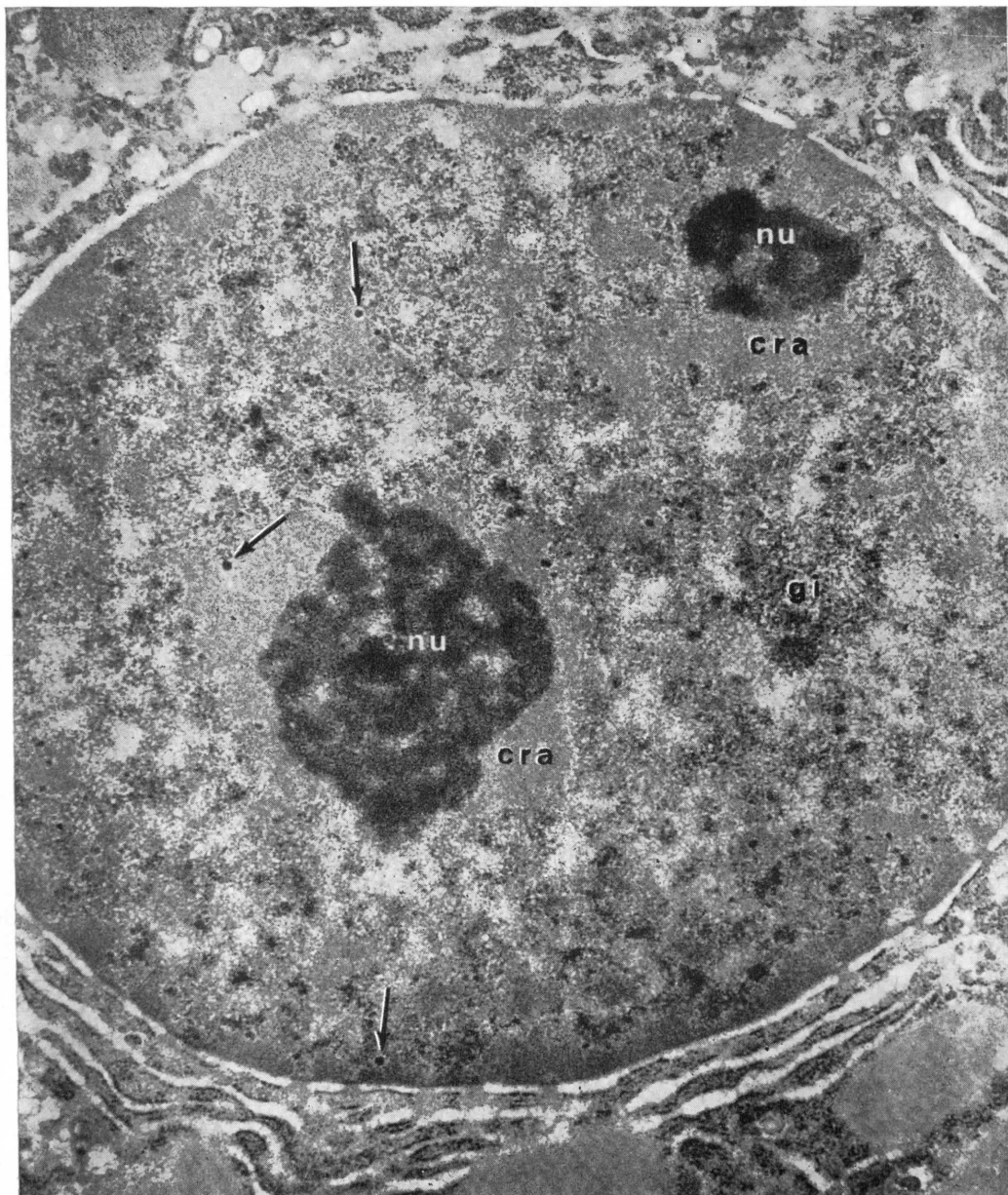


FIG. 16-5. Fotomicrografía electrónica del núcleo de una célula hepática teñida con acetato de uranilo y tratada con EDTA para la visualización de los componentes que contienen ARN. nu, nucléolo; cra, cromatina asociada al núcleo; gi, gránulos intercromatinicos. Con flechas se indican algunos gránulos pericromáticos. 25,000 $\times$. (Cortesía de W. Bernhard.)

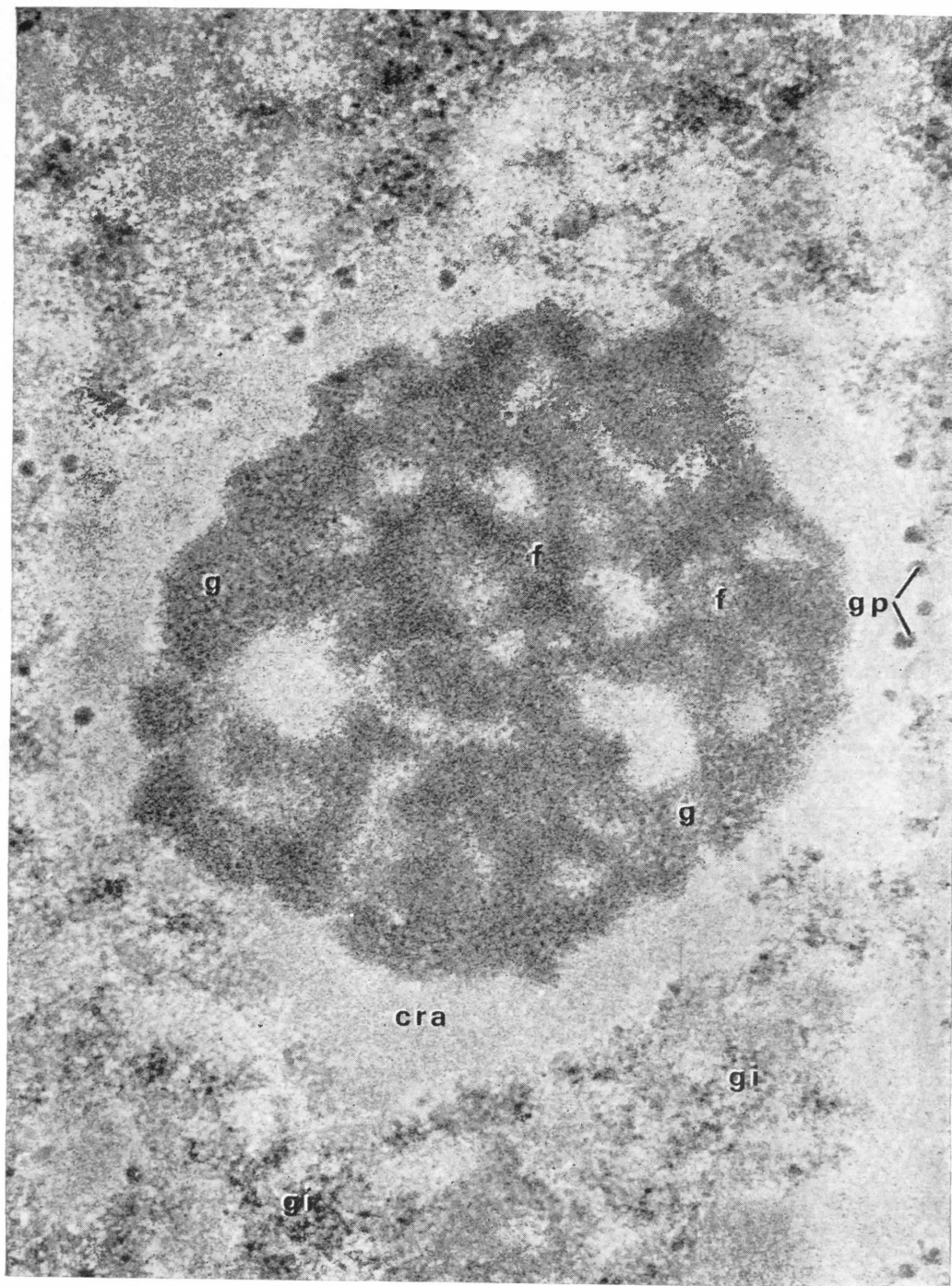


FIG. 16-6. Nucléolo de un hepatocito normal tratado como en la figura 16-5. En el nucléolo se aprecian las porciones fibrilar (*f*) y granular (*g*), y la cromatina asociada (*cra*). *gi*, Gránulos intercromatínicos; *gp*, gránulos pericromáticos. 60,000 $\times$. (Cortesía de W. Bernhard.)

de varios centímetros por cromosoma. Se comprende que si existe sólo una molécula de ADN en cada cromosoma, ésta debe encontrarse muy plegada y comprimida para ocupar una longitud de pocos micrones. Aún más, en células superiores, el ADN está asociado a las histonas y otras proteínas no histónicas (véase cap. 17).

Con el microscopio óptico, se ha reconocido en los cromonemas la estructura básica fibrilar de ellos; sin embargo, el número de cromonemas por cromosomas o por cromatina no pudo determinarse con exactitud. Existe probablemente una escala completa de tamaños, que se modifican con las variaciones cíclicas de la cromatina producidas durante el ciclo vital de las células.

En los cromosomas plumulados se observan fibrillas de 500 A, formadas por dos subunidades de 200 A.²⁷ En el caso de los cromosomas meióticos de la langosta existen *microfibrillas* que miden de 30 a 170 A, las cuales aumentan de tamaño entre la profase temprana y la metafase del espermatozocito. Se considera que las microfibrillas más finas representan moléculas aisladas de nucleoproteína.²⁸⁻³⁰ En la espermátida se aprecian interesantes cambios macromoleculares: en los primeros estadios hay una orientación al azar de microfibrillas de alrededor de 50 A; más adelante, éstas se orientan a lo largo del futuro eje del espermatozoide, partiendo de la región centriolar. Dicha orientación se acompaña del engrosamiento de las microfibrillas, que llegan a 150 A.^{28,29}

Estudios de la estructura cromosómica

Los problemas relacionados con la ultramicrotomía de una estructura tridimensional, como es el caso del conjunto de microfibrillas cromosómicas, fue solucionado parcialmente utilizando técnicas de dispersión similares a las usadas por Kleinschmidt para el ADN vírico y el bacteriano (fig. 4-15). Mediante la dispersión en una interfase aire-agua de núcleos interfásicos y cromosomas metafásicos de diferentes orígenes, pudo realizarse la microscopía electrónica de estos elementos.³¹⁻³⁴ La conclusión más general a la que se llegó con dichos estudios es que los núcleos interfásicos y los cromosomas metafásicos contienen microfibrillas de tamaño similar. Posteriormente se comprobó que el tamaño promedio de las fibrillas metafásicas excede de los 300 A (fig. 16-7), mientras que el de las microfibrillas de la cromatina interfásica oscila entre 230 y 250 A.³⁵ Sin embargo, en cromosomas de espermatozocitos y ovocitos relacionados con la síntesis de ARN, se hallaron microfibrillas más delgadas (de menos de 100 A). Las microfibrillas más gruesas representan probablemente un estado no funcional del cromosoma.³³

El modelo de la fibra plegada en la estructura cromosómica

Se ha sugerido que las fibrillas de 200 a 300 A³⁶ están constituidas, a su vez, por una microfibrilla enroscada, en cuya formación

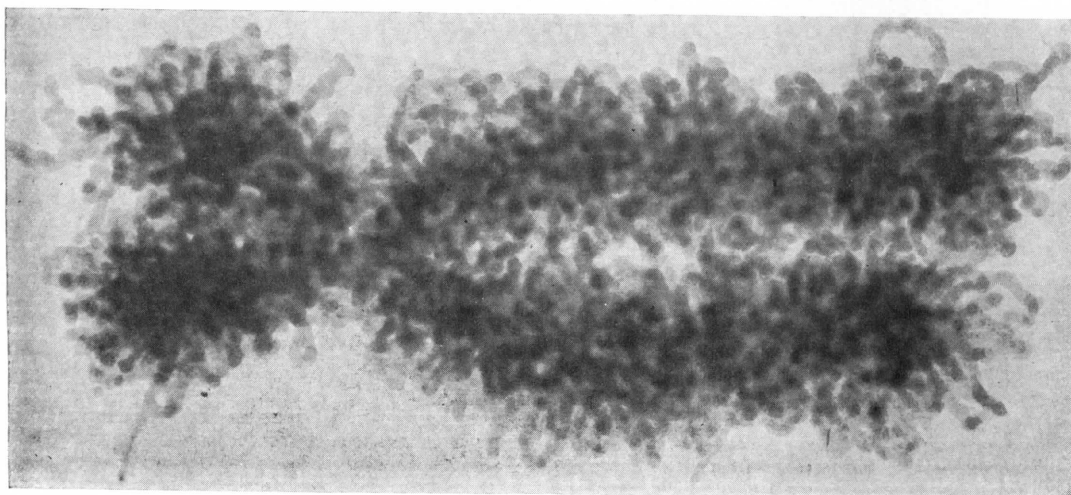


FIG. 16-7. Fotomicrografía electrónica de un cromosoma humano (Nº 12) observado *in toto* con sus dos cromátidas y las fibrillas de 300 A. (Cortesía de E. J. Du Praw.)

interviene una hélice simple de ADN con una proteína asociada. En el denominado "modelo de la fibra plegada" del cromosoma,³⁵ la mayor parte de una *cromátida* de la citología clásica se halla compuesta por una única fibra de ADN-proteína, primariamente enroscada para formar una fibra de 250 a 300 Å que posee pliegues secundarios longitudinales y transversales (fig. 16-8). El modelo es válido tanto para la cromatina interfásica como para el cromosoma metafásico (fig. 16-8). En este último caso, se considera que las dos cromátidas hermanas están sostenidas hasta la anafase, a nivel del centrómero, por un segmento de fibra de ADN no duplicado.

La duplicación del cromosoma durante la síntesis de ADN (período S; véase cap. 17) sería el resultado del desenrollamiento de las hélices de ADN en ciertos puntos, con la formación de los nuevos polinucleótidos de éste.

En la figura 16-8, A y B, la duplicación se lleva a cabo desde el telómero hacia la región centromérica. No obstante, es difícil sostener, considerando la longitud del ADN que debe desenrollarse, la duplicación del ADN de un cromosoma, basada en un modelo de hélice simple, dentro del período sintético. Tampoco puede explicarse la asincronía de la duplicación del ADN observada entre porciones del cromosoma. Parece innecesaria la presencia de puentes especiales, que ciertos autores propusieron para justificar el comienzo de la duplicación del ADN en varios puntos³⁷ (véase cap. 17).

Algunas de las evidencias para este modelo de fibra plegada, constituida por una sola molécula de ADN por cromosoma, surgen del hallazgo de segmentos extremadamente largos de ADN en el núcleo interfásico. Por ejemplo, en el espermatozoide de erizo de mar

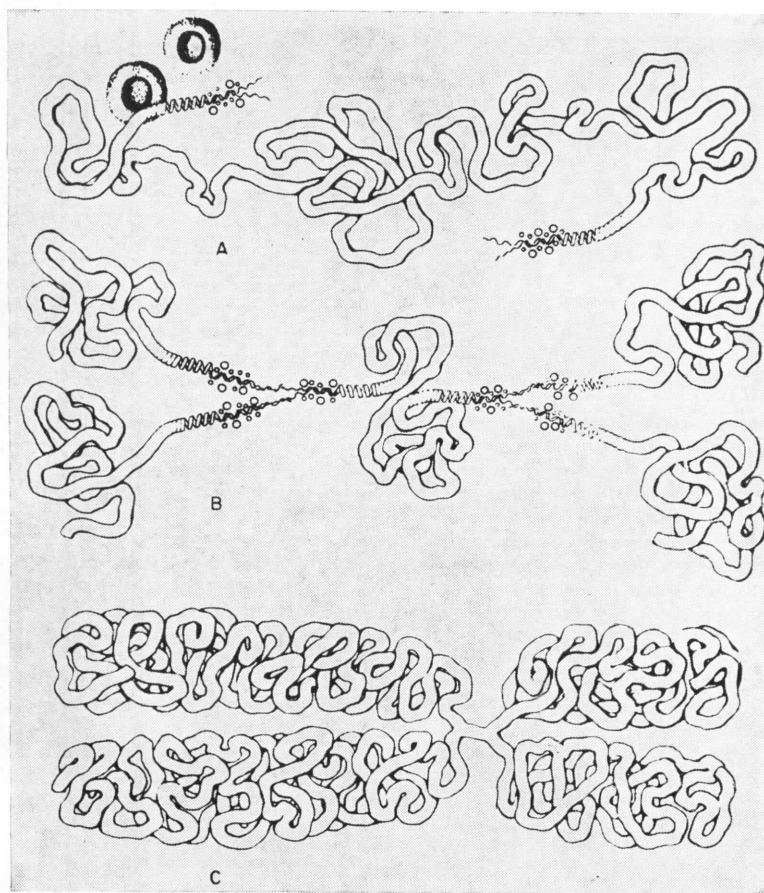


FIG. 16-8. Esquema del modelo de la fibra plegada en cromosomas interfásicos (A y B) y en un cromosoma metafásico (C). (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de E. J. Du Praw.)

se observan con el microscopio electrónico moléculas de 50 a 90 μ (fig. 16-9),³⁸ y en diferentes núcleos de mamíferos se reconocieron, mediante radioautografía moléculas de ADN continuas que miden de 1 mm a 2,2 cm de longitud.^{39,40} Se ha calculado que la longitud del ADN contenido en un cromosoma humano del primer par es de 7,3 cm, y que podría estar enrollado en fibras de 230 Å de ancho por 1306 μ de longitud en cada cromátida. Dicha cifra debe ser comparada con la longitud del cromosoma metafásico. Esto indica que en este período el plegamiento de la fibra interfásica alcanza un cociente de compresión de 122:1, plegamiento que correspondería a las espirales mayor y menor representadas en la figura 3-4. Es interesante

destacar que en la cabeza de un bacteriófago el ADN está plegado en una proporción de 520:1.³⁶

Ultraestructura de la heterocromatina

Como ya se mencionó, la heterocromatina representa regiones condensadas del cromosoma. Los estudios de microscopía electrónica demostraron que está compuesta por fibras cromatínicas idénticas a las de las regiones eucromáticas, variando sólo en el grado de plegamiento, que es mayor en la heterocromatina.³⁶ Esta propiedad podría ser la causa de alguna de las características metabólicas de la heterocromatina, como la ausencia de

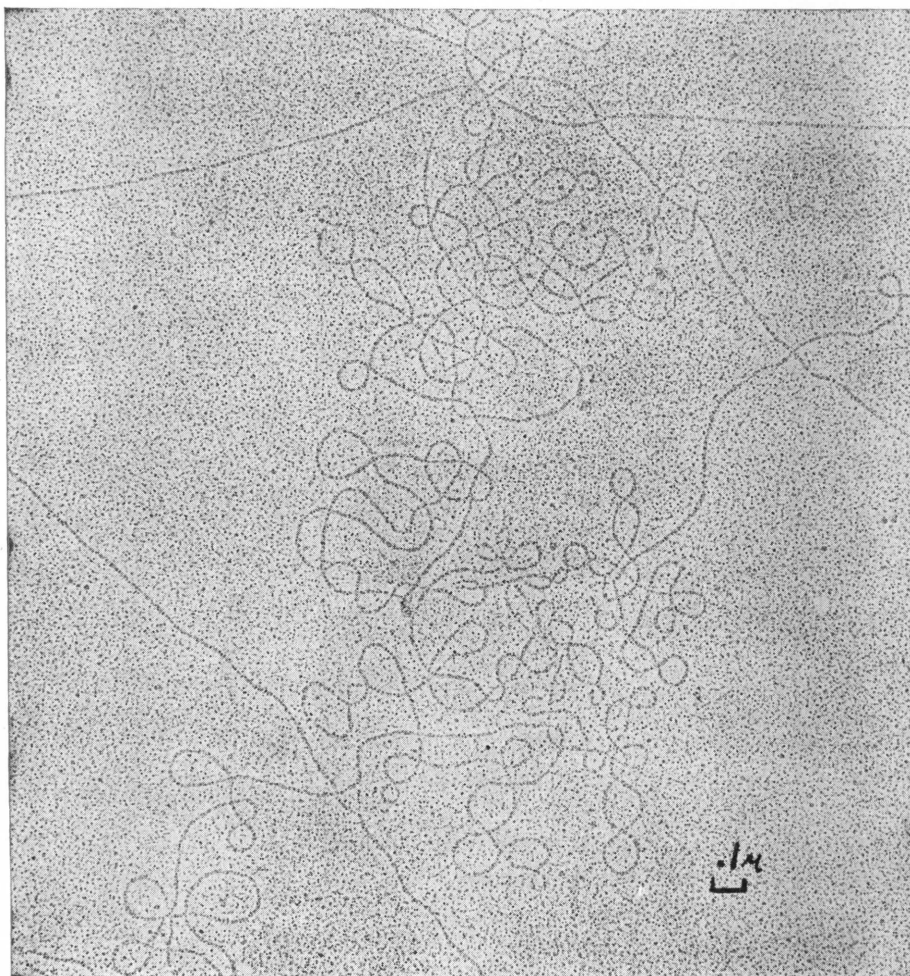


FIG. 16-9. Demostración de que el ADN es un largo polímero. Microfotografía electrónica de una molécula de ADN extraída de un espermatozoide. Véase la continuidad de la molécula, a pesar de las numerosas vueltas. Sombreado con platino. (Cortesía de J. Solari y D. Mazia.)

síntesis de ARN, su inercia genética y su duplicación tardía.⁴¹

Ultraestructura del centrómero

El centrómero o región quinetocórica fue descrito como una zona del cromosoma metafísico en la cual se observa una constricción primaria (véase cap. 3). Cuando se estudian cromosomas enteros con el microscopio electrónico, en esta región aparecen fibras cromáticas similares a las que se aprecian en los brazos y en continuidad con ellas. Se calcula que a través del centrómero pasan de 5 a 7

fibras cromáticas de 230 Å.³⁶ Existe además un gránulo quinetocórico denso que actúa aparentemente como cemento en la unión de los microtúbulos del huso con el cromosoma. Las dos funciones del centrómero, es decir, la de sostener las dos cromátidas hermanas y la de unir las fibras del huso, se atribuyen por tanto a dos componentes distintos. Como se dijo antes, en el modelo de fibra plegada del cromosoma la separación de las cromátidas hermanas con los respectivos componentes del huso resultaría de la duplicación de la cromatina quinetocórica. En cortes delgados de gran variedad de célu-

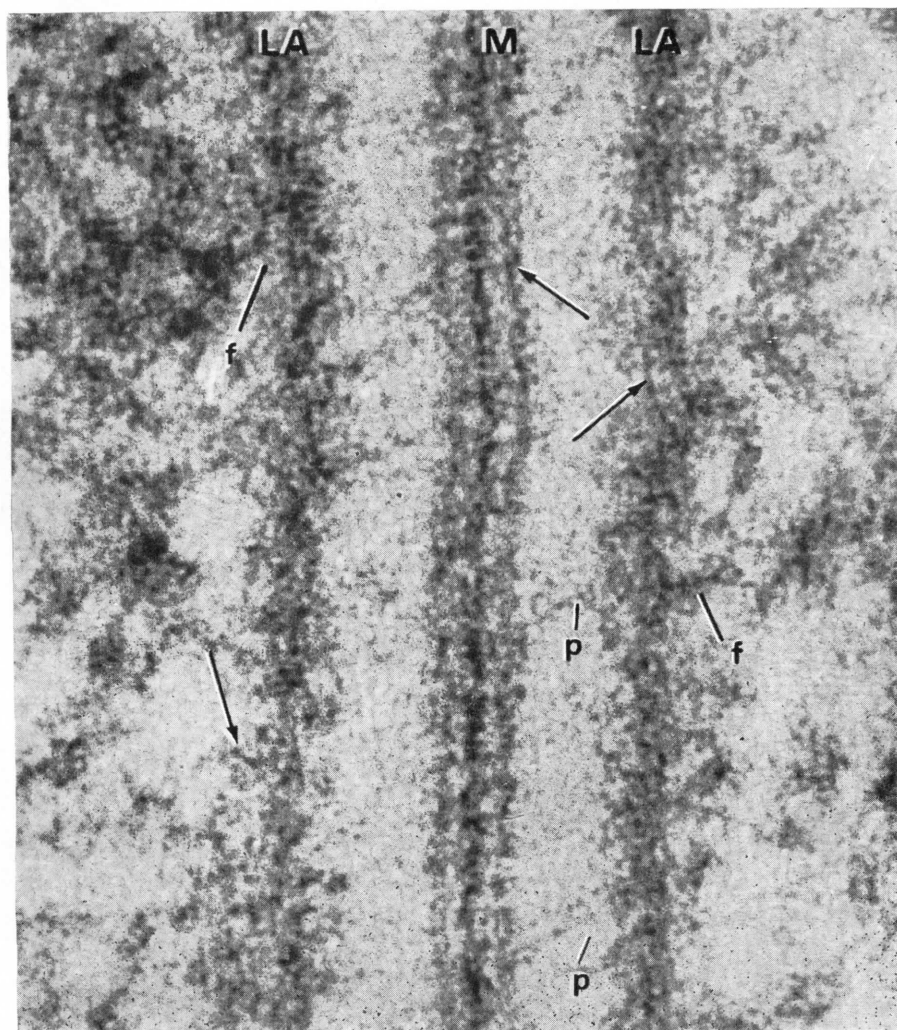


FIG. 16-10. Corte longitudinal de un complejo sinapteinémico en un espermatocito de *Gryllus argentinus*. Obsérvese la estructura tripartita con el componente medial (M) y los brazos laterales (LA). En p, se indica puentes entre ambos componentes. Con flechas están marcadas algunas microfibrillas de 20 Å que forman parte de la estructura del cromosoma. 400,000 $\times$. (Cortesía de J. R. Sotelo.)

las se observó que cada cromosoma contiene dos gránulos quinetocóricos hermanos en forma de disco, localizados en sitios opuestos. Esos discos tienen un diámetro de $0,2\ \mu$, presentan una estructura trilaminar y están unidos a 4-7 túbulos del huso.⁴²

El complejo sinaptinémico de los cromosomas meióticos

Las etapas de la profase meiótica fueron descritas en el capítulo 13. Uno de los fenómenos más importantes que se producen en este período es el apareamiento lineal (sinapsis) y el intercambio de cromátidas homólogas (*crossing-over*). En el momento en que ocurren estos procesos, aparece en los cromosomas una diferenciación que se denomina *complejo sinaptinémico* (CS).⁴³⁻⁴⁵ El CS es una estructura axil ubicada entre los cromosomas homólogos que realizan la sinapsis, constituida por dos líneas laterales densas enroscadas entre sí, que flanquean una línea central o filamento medial (fig. 16-10). En cortes seriados de espermatocitos de grillo pudo identificarse el CS de cada uno de los 14 bivalentes (homólogos apareados). También se reconocieron otros

dos CS: uno en una autosoma y el otro uniendo la cromatina sexual con el nucléolo.⁴⁶ En la figura 16-10 se aprecian los elementos laterales o brazos del complejo correspondiente a cada cromosoma. Estos brazos laterales están unidos al cromosoma adyacente por fibrillas de 100 Å. El filamento medial posee una estructura trilaminar, y existen puentes que lo unen a los brazos laterales. Alrededor del CS, el material microfibrilar constituye el grueso de los cromosomas. El CS completo así descrito se observa sólo en las regiones de apareamiento. En aquellas otras en las que este proceso aún no ocurre, se ven divergir los brazos laterales del CS. El esquema de la figura 16-11 incluye una interpretación de la forma en que el CS estaría relacionado con el proceso de apareamiento durante la profase meiótica.⁴⁷

El problema de la formación del CS se vincula con la síntesis de ADN durante la profase meiótica, síntesis que corresponde a menos del 0,3 por ciento del ADN total⁴⁸ (véase cap. 17). Usando un inhibidor de la síntesis de ADN (desoxiadenina), se ha conseguido detener la formación del CS.⁴⁹ La formación completa de éste parece depender de la continuación de la síntesis del ADN durante el período cigoteno. Para más detalles concernientes a la ultraestructura de los cromosomas meióticos, véase 50.

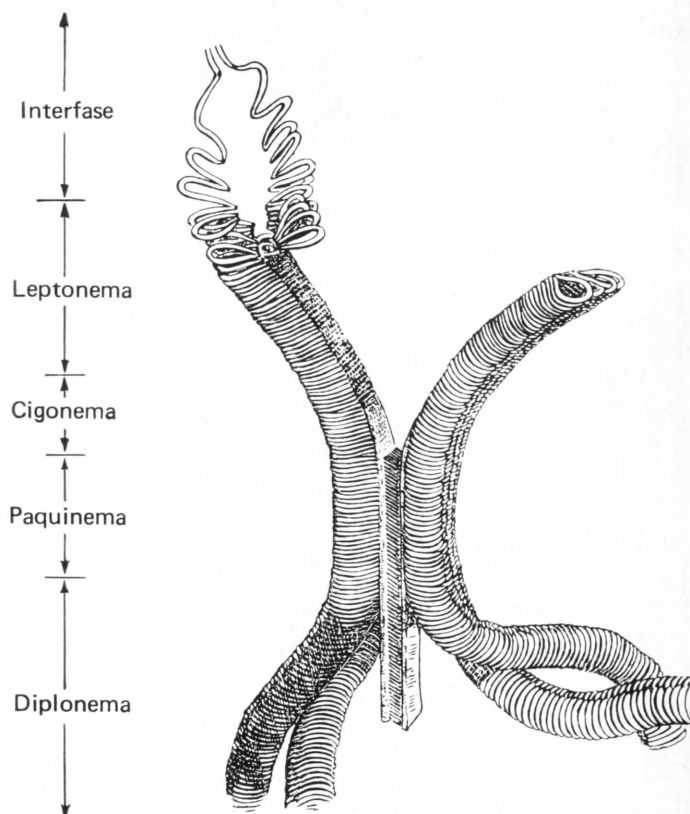


FIG. 16-11. Esquema tridimensional del complejo sinaptinémico (CS) en distintos estadios de la meiosis. En el paquinema, cuando los dos cromosomas homólogos están completamente apareados, se hallan unidos por el CS. Este complejo se separa en el diplonema y las cromátidas muestran una espiral relacional. (Cortesía de T. F. Roth.)

EL NUCLEÓLO

La presencia de los nucleólos como gránulos intranucleares densos fue descrita por primera vez por Fontana en 1781. A fines del siglo pasado creyó advertirse una relación entre el tamaño del nucleólo y la actividad sintética de la célula. En las células con escasa síntesis proteica (espermatozoides, blastómeras, células musculares) los nucleólos eran pequeños o habían desaparecido; en cambio, eran voluminosos en ovocitos, neuronas y células secretoras, en las cuales la síntesis de proteínas es importante. En la célula viviente, se presentan como cuerpos muy refringentes (fig 2-2), debido a la gran concentración de material sólido (40-85 por ciento del peso seco), el cual puede medirse mediante microscopia de interferencia de fase⁵¹ (véase capítulo 6). Con el microscopio óptico, el nucleólo aparece generalmente como una estructura homogénea, aunque en ocasiones se observan pequeños corpúsculos o vacuolas.

Los estudios realizados en células vivientes con microscopia de contraste de fase y cinemicrografía en cámara lenta evidencian que las vacuolas formadas dentro del nucleólo pueden moverse hacia la periferia constituyendo áreas claras. El nucleólo se encuentra frecuentemente adherido a la membrana nuclear, por lo que algunas de esas vacuolas y material provenientes de la zona densa pasarían al citoplasma.⁵² Se ha descrito también en células vivientes, particularmente después de tinciones argentícas, una estructura filamentosa denominada *nucleolonema*.⁵³

Aislamiento del nucleólo

El nucleólo ha sido aislado en ovocitos de animales marinos,^{54, 55} así como en células hepáticas (fig. 17-2). Los nucleólos aislados poseen de 3 a 5 por ciento de ARN; ésta es una cantidad menor de la que indican las observaciones citoquímicas, pero podría haber cierta pérdida durante la extracción.⁵⁶⁻⁵⁸ En nucleólos de embriones de guisantes, el contenido de ARN es del 10 por ciento y representa el 20 por ciento del ARN total del núcleo.^{58, 59} En su composición de bases el ARN nucleolar es muy similar al ribosómico. Su contenido en proteínas es alto y, de acuerdo con algunos investigadores, los principales componentes proteicos son fosfoproteínas.⁵⁴ No se han encontrado histonas en nucleólos aislados, y después de aplicar la reacción del verde rápido (*fast green*), ésta es negativa. Hay

evidencias citoquímicas que indican la existencia en el nucleólo de concentraciones elevadas de ortofosfato, el cual podría servir como precursor del fósforo del ARN.⁶⁰

Poco se sabe acerca del contenido en enzimas. Por medio de técnicas de aislamiento se halló fosfatasa ácida, nucleósido-fosforilasa y enzimas sintetizantes de DPN. Estas dos últimas son importantes puesto que actúan en la síntesis de nucleótidos y coenzimas.⁵⁵ En el nucleólo de diversas células se identificó a la ARN-metilasa, que trasfiere grupos metilos a las bases del ARN.⁶¹

Citoquímica

Después de la fijación el nucleólo es Feulgen-negativo, lo que indica falta de ácido desoxirribonucleico. En cambio se colorea con pironina y otras sustancias, y absorbe la luz ultravioleta a 2600 Å (fig. 4-12). El tratamiento con ribonucleasa revela que esta tinción, la basofilia y la absorción ultravioleta dependen de la presencia de ARN.

El nucleólo puede estar rodeado de un anillo de cromatina Feulgen-positiva (fig. 7-9), que representa regiones heterocromáticas del cromosoma asociadas al nucleólo. En nucleólos grandes pueden observarse algunos gránulos Feulgen-positivos en porciones de los cromosomas que penetran en el nucleólo. Se comprueba también en raíces vegetales tratadas con ribonucleasa que el nucleólo pierde su basofilia, lo cual indicaría que esta enzima puede penetrar en la célula viviente (figura 16-12).

Ultraestructura

La microscopia electrónica pone de manifiesto una organización submicroscópica definida dentro del nucleólo. La estructura es compacta en algunas células, mientras que en otras existen regiones claras que comunican con el nucleoplasma (fig. 16-6). En la mayor parte de los nucleólos pueden reconocerse los siguientes componentes: a) Una *porción granular*, constituida por gránulos densos de 150 a 200 Å, dispuestos generalmente en la periferia.

b) Una *porción fibrilar*, compuesta por fibrillas de 50 a 80 Å (fig. 16-6). Tanto los gránulos como las fibrillas son digeridos por la ribonucleasa y están formados por ribonucleoproteínas.⁶²

c) En algunos nucleólos se observa una *región amorfa*, de baja densidad electrónica y constituida por proteínas sobre las cuales actúa la pepsina.

d) La *cromatina asociada con el nucléolo* situada alrededor de esta estructura, posee frecuentemente ramificaciones intranucleolares (figs. 16-4 y 16-6). Estudios realizados con radioautografía y ultracentrifugación (véase cap. 18) coinciden en reafirmar que la porción fibrilar es precursora de la granular y que ambas contienen ribonucleoproteínas precursoras, a su vez, de los ribosomas citoplásmicos.

Los experimentos realizados con células de cultivo expuestas a temperaturas supramáximas (por ejemplo, 43°C durante una hora) han demostrado que el nucléolo es termosensible. El cambio fundamental radica en una pérdida de la porción granular y de la cromatina intranuclear. El material restante está compuesto esencialmente por ribonucleoproteínas fibrilares. Estas alteraciones son reversibles cuando las células se reincuban a 37°C. Es probable que la sensibilidad térmica se relacione con la síntesis de ARN dependiente del ADN.⁶³ Una inhibición semejante de la transcripción ADN → ARN se produce al administrar dosis bajas de actinomicina D⁶⁴, pero en este caso tiene lugar una segregación de las ribonucleoproteínas nucleolares de tipos *granular* y *fibrilar*. Diversos antimetabolitos inducen, del mismo modo, una segregación de los componentes nucleolares.²⁵

Se ha demostrado fehacientemente que el nucléolo está vinculado con la biogénesis de los ribosomas citoplásmicos; en el capítulo 18 se analizará con más amplitud este tema. En nucléolos con estructura abierta (nucleolomena), las partes menos densas deben inter-

pretarse como nucleoplasma que penetra a través de la masa nucleolar. Las observaciones sobre el pasaje de material nucleolar hacia el citoplasma en células vivientes, se han corroborado en células fijadas. Este fenómeno es particularmente manifiesto en ovocitos de anfibio, en los cuales se aprecian alrededor de 1000 nucléolos en el período paquitenio. Se ha visto pasar a través de los poros de la envoltura nuclear un material de probable origen nucleolar que penetra en el citoplasma (fig. 18-11).⁶⁵

Ciclo mitótico

Durante la mitosis los nucléolos experimentan cambios cíclicos. Los primeros estudios efectuados al respecto pusieron de relieve: 1) que los nucléolos desaparecen aparentemente al comienzo de la división celular (profase), mientras que los cromosomas se tiñen con más intensidad, y 2) que los nucléolos reaparecen al final de la división (telofase). La conexión entre los ciclos nucleolar y cromosómico ha sido esclarecida parcialmente al demostrarse, en células vegetales, la íntima relación existente entre los nucléolos y ciertos cromosomas: cada nucléolo se encuentra en contacto con un cromosoma; el punto de unión es una región especial denominada "organizador del nucléolo" (véase cap. 3). En la te-

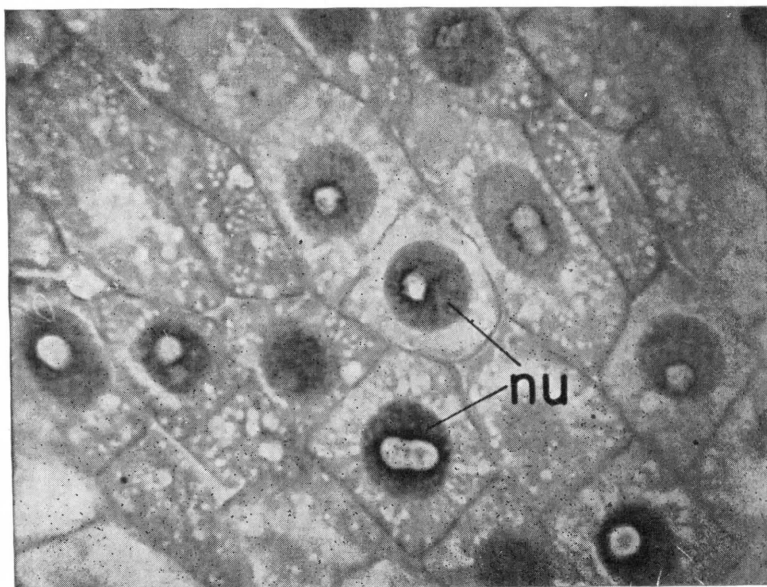


FIG. 16-12. Raíz de *Allium cepa* tratada in vivo con ribonucleasa durante 3 horas. Se advierte la desaparición de la basofilia nucleolar mientras que se conserva la de la cromatina nuclear. Coloración con azul de toluidina a pH 4.6. (Cortesía de Pérez del Cerro y Solari.)

lofase, la sustancia nucleolar puede provenir de la fusión de pequeños "cuerpos prenucleolares" que están agrupados junto al organizador nucleolar.⁶⁶

En células meristemáticas de *Allium cepa* se observó que el nucleólo contiene una asa de cromatina (ADN) que se extiende desde el cromosoma nucleolar. En la profase tardía, el asa se retrae de manera gradual y forma un ovillo en la zona nucleolar del cromosoma correspondiente. Al mismo tiempo, ocurre la dispersión paulatina de los materiales nucleolares granular y fibrilar en el nucleoplasma. En la telofase, la reconstitución nucleolar comprende dos etapas. En el comienzo y hasta promediar la telofase, el nucleólo está constituido por un ovillo de cromatina que se desenrosca desde el organizador nucleolar y es rodeado de material fibrilar y granular. Al concluir la telofase, el nucleólo presenta ya la morfología característica de la interfase. Estos hechos sugieren que el único componente constante del nucleólo es el asa cromatinica, que contiene la información genética para la síntesis del material nucleolar (Chouinard, 1969).

Mediante tinciones argénticas se ha visto pasar del núcleo profásico al citoplasma un material presumiblemente proteico o lipoproteico.^{67,68} Este vuelve luego a los cromosomas hijos en la telofase.⁶⁹ Otros experimentos con valina-³H sugieren, asimismo, que alguna proteína nucleolar puede ser transportada al nucleólo cuando éste se reconstituye después de la división de la célula.^{70,71}

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Congdon, C. C. and Mori-Chavez, P. (eds.): (1964) The control of cell division. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 14.
- Du Praw, E. J.: (1968) *Cell and molecular biology*. Academic Press, New York.
- Lima de Faria, A. (ed.): (1969) *Handbook of molecular cytology*. North Holland Pub. Co.
- Mirsky, A. E. and Osawa, S.: (1961) *The interphase nucleus in the cell*, vol. 2. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Taylor, J. H.: (1966) The duplication of chromosomes. In: *Probleme der biologischen Reduplikation*. (P. von Sette, ed.) Springer-Verlag, Berlin.
- Valencia, J. I. and Grell, R. F. (eds.): (1965) Genes and chromosomes; structure and function. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 18.
- Vincent, W. S. and Miller, L. L. (eds.): (1966) The nucleolus its structure and function. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23.
- Wagner, R. P. (ed.): (1969) Nuclear Physiology and differentiation. *Genetics*, 61.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Holtfreter, J.: (1954) *Exp. Cell Res.*, 7:95.
- Feldherr, C. M. and Feldherr, A. B.: (1960) *Nature*, 185:250.
- Fauré-Fremiet, E. and Roullier, C.: (1958) *Exp. Cell Res.*, 14:29.
- Mirsky, A. E. and Osawa, S.: (1961) The interphase nucleus. In: *The cell*, vol. 2, p. 677. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Barer, R., Joseph, S. and Merck, G. A. (1959) *Exp. Cell Res.*, 18:179.
- Callan, H. G. and Tomlin, S. G.: (1950) *Proc. roy. Soc. London*, ser. B, 137:367.
- Watson, M.: (1955) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1:257.
- Afzelius, B. A.: (1955) *Exp. Cell Res.*, 8:147.
- Gall, J. G.: (1956) *Brookhaven Symp. Biol.*, 8:17.
- Wischnitzer, S.: (1958) *J. Ultrastruct. Res.*, 1:201.
- Watson, M. L.: (1959) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6:147.
- Fawcett, D. W.: (1966) *Amer. J. Anat.*, 119:129.
- Pappas, G. D.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:221.
- Gall, J. G.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:391.
- Stevens, B. J. and Swift, H.: (1966) *J. Cell Biol.*, 31:55.
- Feldherr, C. M.: (1965) *Exp. Cell Res.*, 38:670.
- Loewenstein, W. R. and Kanno, Y.: (1962) *Nature*, 195:462.
- Loewenstein, W. R., Kanno, Y. and Ito, S.: (1966) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 137:708.
- Bahr, G. F.: (1954) *Exp. Cell Res.*, 7:457.
- De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:785.
- Watson, M. L.: (1962) In: *Electron microscopy V Int. Congr. of Electron Microscopy*. (Breese, S. S., ed.) Academic Press, New York.
- Albersheim, P. and Killias, V.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:93.
- Lobel, C. R. and Beer, M.: (1961) *J. Biophys. biochem. Cytol.*, 10:335.
- Leduc, E. H. and Bernhard, W.: (1962) In: *The interpretation of ultrastructure*, p. 21. (Harris, R. J. C., ed.) Academic Press, New York.
- Simard, R. and Bernhard, W. (1966) *Int. J. Cancer*, 1:463.
- Bernhard, W.: (1968) *Excerpta med. Int. Congr.*, Series, 166:20.
- Ris, H.: (1957) In: *The chemical bases of heredity*, p. 23. (McElroy, W. D. and Glass, B., ed.) John Hopkins Press, Baltimore.
- De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:785.
- De Robertis, E.: (1964) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 14:33.
- Sotelo, J. R. and Wettstein, R.: (1965) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 18:133.
- Gall, J. G.: (1963) *Science*, 139:120.
- Du Praw, E. J.: (1965) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 53:161.
- Gall, J. G.: (1966) *Chromosoma*, 20:221.
- Wolfe, S. L.: (1965) *J. Ultrastruct. Res.*, 12:104.

35. Du Praw, E. J. (1965) *Nature*, 206:338 and (1966) *Nature*, 209:1577.
36. Du Praw, E. J. (1968) *Cell and molecular Biology*. Academic Press, New York.
37. Freese, E.: (1963) In: *Molecular genetics*, part I. (Taylor, J. H., ed.) Academic Press, New York.
38. Solari, A. J.: (1965) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 53:503.
39. Cairns, J.: (1963) *Proc. 16th Int. Congr. Zool.*, 4:271.
40. Sasaki, M. S. and Norman, A.: (1966) *Exp. Cell Res.*, 44:642.
41. Brown, S. W.: (1966) *Science*, 151:417.
42. Jokelainen, P. T.: (1967) *J. ultrastruct. Res.*, 19:19.
43. Moses, M. J.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:633.
44. Moses, M. J.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:633.
45. Moses, M. J.: (1964) In: *Cytology and Cell Physiol.* (Bourne, G. H., ed.) Academic Press, New York, p. 424.
46. Wettstein, R. and Sotelo, J. R.: (1967) *J. Microscopie*, 6:557.
47. Roth, T. F.: (1966) *Protoplasma*, 61:346.
48. Hotta, Y., Ito, M. and Stern, H.: (1966) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:1184.
49. Rothm, T. F. and Ito, M.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:247.
50. Sotelo, J. R.: (1969) In: *Handbook of molecular Cytology*. (A. Lima de Faria, ed.) North Holland, Pub. Co.
51. Vicent, W. S.: (1955) *Int. Rev. Cytol.*, 4:269.
52. González Ramírez, J.: (1963) Considerations on nucleolar physiology. In: *Cinemicrography in cell Biology*, p. 429. (Rose, G. G., ed.) Academic Press, New York.
53. Estable, C. and Sotelo, J. R.: (1950) *Inst. C. Biol. (Montevideo)*, 1:105.
54. Vicent, W. S.: (1952) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 38:139.
55. Baltus, E.: (1954) *Biochim. biophys. Acta*, 15:263.
56. Monty, K. J., Litt, M., Kay, E. R. M. and Dounce, A. L.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:127.
57. Birstiel, M. L. and Chipchase, M. I. H.: (1963) *Fed. Proc.*, 22:473.
58. Maggio, R., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1963) *J. Cell Biol.*, 18:267, 293.
59. Stern, H., Johnston, F. and Seeterfield, G.: (1959) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6:57.
60. Tandler, C. J. and Sirlin, J. L.: (1962) *Biochim. biophys. Acta*, 55:228.
61. Sirlin, J. L., Jacob, J. and Tandler, C. J.: (1963) *Biochem. J.*, 89:447.
62. Marinozzi, V. and Bernhard, W.: (1963) *Exp. Cell Res.*, 32:595.
63. Simard, R. and Bernhard, W.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:61.
64. Perry, R. P.: (1964) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 14:73.
65. Miller, O. L.: (1962) Studies on the ultrastructure and metabolism of nucleoli in amphibian cocytes. *Fifth Internat. Congress for Electron Microscopy*, vol. 2, p. NN-8. (Breese, S. S., Jr., ed.) Academic Press, New York.
66. Lafontaine, J. G. and Chouinard, L. A.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:167.
67. Tandler, C. J.: (1954) *J. Histochem. Cytochem.*, 2:165.
68. Tandler, C. J.: (1959) *Exp. Cell Res.*, 17:560.
69. Das, N. K.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 26:428.
70. Harris, H.: (1961) *Nature*, 190:1077.
71. Sirlin, J. L.: (1962) *Prog. Biophys.*, 12:25.

Citoquímica del núcleo. Duplicación del ácido desoxirribonucleico

Después de haber estudiado al núcleo y los cromosomas con los clásicos métodos citológicos y citogenéticos, así como en su aspecto ultraestructural, será posible interpretar ahora las funciones atinentes a ellos, desde los puntos de vista químico y macromolecular.

El capítulo que nos ocupa constituye una introducción a la parte de la Biología conocida actualmente como *Genética molecular*, que incluye el control y regulación de las funciones celulares.

Este nuevo campo está dominado por el papel central que desempeñan los ácidos nucleicos en cuanto a las funciones genéticas. Algunas de las primeras evidencias al respecto provinieron de la *transformación bacteriana*, por medio de la cual una cepa de bacterias podía cambiarse genéticamente valiéndose de la acción de extractos de otras cepas. Avery y colaboradores demostraron, en 1944, que la sustancia responsable de este efecto transformador era el ácido desoxirribonucleico (ADN).¹

El ADN puede considerarse como el principal constituyente genético de la célula, el cual transporta o lleva en forma de código la información de una célula de un organismo a otro. El ácido ribonucleico (ARN) reemplaza al ADN en algunos virus de vegetales y es capaz también de transportar o de servir como intermediario en la transferencia de la información genética que, finalmente, se expresa por la elaboración de las diferentes proteínas específicas de las células.

El esquema de la figura 17-1 ejemplifica adecuadamente estos conceptos preliminares y representa lo que en la actualidad se considera el *dogma central* de la Biología molecular. Existen tres fases en la transferencia de la información genética: 1) *duplicación* de

la molécula de ADN y, de este modo, duplicación de la información genética por medio del mecanismo del moldeado; 2) *transcripción* de la información a distintas moléculas de ARN, y 3) traducción final de diferentes compuestos proteicos (incluyendo a las enzimas) de la célula. Mientras que los pasos 2 y 3 serán analizados detenidamente en el capítulo 19, aquí se estudiará el problema de la duplicación del ADN en relación con la organización química y macromolecular del núcleo. Para investigar este aspecto fundamental, las células de vegetales y animales superiores convienen menos que las bacterias, en las cuales dichos mecanismos siguen un molde similar aunque más sencillo. Por esa causa, en este y otros capítulos se expondrán algunas nociones referentes a la indagación en microorganismos simples.

ESTUDIO CITOQUÍMICO DEL NÚCLEO

El estudio de la organización química del núcleo ha seguido dos líneas principales de investigación. Una, esencialmente bioquímica, ha tratado de aislar núcleos en número suficiente como para analizarlos por métodos bioquímicos. La segunda, principalmente citológica, emplea técnicas citofotométricas y autorradiográficas, ya estudiadas en el capítulo 7. Los resultados de ambos métodos son complementarios y se integrarán en el curso de la exposición sobre la organización química y fisiológica del núcleo.

Este campo fundamental comenzó en 1869 con las experiencias de Miescher, quien analizó la composición química del pus, espermatozoides, células rojas nucleadas de las aves, etc. y demostró que los ácidos nucleicos son uno de los principales componentes nucleares.

Una nueva fuente de valiosa información la constituye el cultivo de células tumorales humanas de la cepa HeLa. Con el fin de aislar sus núcleos, las células son sometidas primero a un medio hipotónico y luego homogeneizadas suavemente. A continuación se centrifuga este homogenato y los núcleos así aislados se tratan con agentes tensioactivos para liberarlos de restos de citoplasma adherente. Mediante este último paso se desprende, además, la membrana nuclear externa y algunos pocos ribosomas residuales. Es posible obtener una subfracción nucleolar colocando los núcleos en soluciones de fuerza iónica elevada y digiriendo la cromatina con ADNasa.² Recientemente se efectuaron estudios de microscopia electrónica de las fracciones purificadas. En la figura 17-2 se representan núcleos y nucléolos aislados de hepatocitos.

El número de núcleos aislados de un tejido en crecimiento (por ejemplo, de un embrión o de cultivo de tejidos) puede calcularse ahora con facilidad en una cámara similar a las empleadas para recuento de glóbulos, siendo posible determinar la cantidad de un compuesto químico por núcleo (por ejemplo, ADN).

El principal resultado de esos estudios bioquímicos es que el núcleo tiene una organización química compleja, en la cual los componentes más importantes son las *nucleoproteínas*. Estas resultan de la combinación de ácidos nucleicos y proteínas, y en ciertas cé-

lulas constituyen la mayor parte del material sólido (96 por ciento en el espermatozoide de la trucha, casi el 100 por ciento en algunos núcleos de eritrocitos).³

La parte proteica del núcleo es muy compleja y posee varios componentes. De éstos, los que se conocen mejor son dos tipos de proteínas simples y fuertemente básicas: las protaminas y las histonas. Además de ellas, existen varias proteínas ácidas, denominadas no histónicas, que representan el componente más abundante del núcleo interfásico.

Las primeras experiencias indicaban que el ADN era el único ácido nucleico que se hallaba en el núcleo.

Posteriormente se descubrió la presencia de complejos ARN-proteína, libres de ADN, que podían extraerse con ClNa 0.14 M. En hepatocitos, el ARN representa menos del 5 por ciento de la masa seca, mientras que entre el 85 y el 90 por ciento del ARN total es citoplásmico. El ARN nuclear se distribuye en el nucléolo, la cromatina y la cariolinfa.

Los cromosomas metafásicos de células de cultivo de tejidos han sido aislados con un alto grado de pureza; su composición porcentual es: ADN, 16; ARN, 12, y proteínas, 72. Por lo menos, el 50 por ciento de la proteína pertenece al tipo ácido.⁴

Resumiendo, la composición química del núcleo comprende: 1) proteínas nucleares, como nucleoprotaminas, nucleohistonas y proteínas ácidas o no histónicas, y enzimas; 2) ADN, y 3) ARN.

TABLA 17-1. Proteínas intranucleares del hígado (Según Steele y Busch, 1963.)

Extracción		Proteína	ADN	ARN	Fracción
ClNa	0.14 M	17	1.5	3.4	"Jugo nuclear" soluble.
Tris	0.10 M	5.3	6.8	10.8	Ribonucleoproteína.
ClNa-1	2 M	54	31	5.2	Histonas básicas ligadas al ADN.
ClNa-2	2 M	10	12.2	5.1	No histonas ligadas al ADN.
NaOH	0.05 N	5.6	0.3	8.9	Proteínas ácidas no ligadas al ADN.
Residual		2.2	—	0.6	Residual.

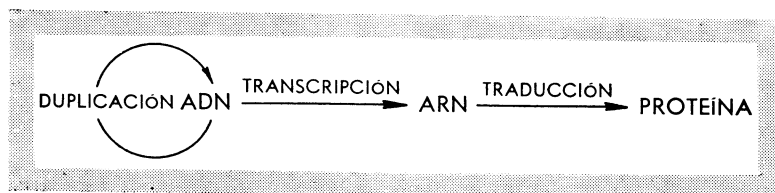


FIG. 17-1. Esquema del flujo de información de un genoma (ADN). (De S. Spiegelman.)

Proteínas nucleares

Los progresos en las técnicas de extracción permitieron reconocer nuevos tipos de proteínas nucleares, aparte de los ya mencionados.⁵ En la tabla 17-1 se incluyen datos acerca de estos métodos, el porcentaje de peso seco, el contenido de ADN y ARN, y sus principales características.

Nucleoprotaminas

Las *protaminas* constituyen proteínas básicas simples con un peso molecular muy bajo (alrededor de los 4000 Daltons). Son muy ricas en el aminoácido básico arginina, lo cual les confiere un punto isoelectrico de pH 10-11. Se encuentran en los espermatozoides de algunos peces, fuertemente ligadas al ADN por uniones salinas. En general, están compuestas por 28 residuos polipeptídicos, con una longitud total de 100 Å, que poseen 19 argininas y de 8 a 9 aminoácidos no básicos.⁶ En el núcleo del espermatozoide de trucha, el complejo ADN-protamina representa el 91 por ciento del peso seco.³ Este complejo ofrece a la difracción de rayos X imágenes que han sido interpretadas como el resultado de una configuración en la cual la protamina envuelve helicoidalmente a la molécula de ADN, ocupando el surco poco profundo que éste le deja.⁷ Por medio de técnicas citoquímicas se ha comprobado que durante el desarrollo del espermatozoide hay un reemplazo progresivo de la histona por protamina.⁸ Ello puede deberse a que ésta tiene mayor afinidad con el ADN. Bioquímicamente, existen tres tipos de espermatozoides, según que el ADN forme complejos con protamina (salmón, arenque, trucha, gallo, caracol y calamar), con histonas (plantas, carpa, erizo de mar) o con otra clase de proteínas (la mayor parte de los mamíferos).⁹

Nucleohistonas

Las *histonas* son también proteínas básicas, pero presentan mayor heterogeneidad que las protaminas. Su aislamiento a partir del complejo que forman con el ADN es dificultoso, debido a que se asocian con las proteínas ácidas ligadas al ADN (tabla 17-1). Se asemejan a las protaminas por el alto contenido en arginina y por el punto isoelectrico muy básico (pH 10-11). Su peso molecular es superior al de aquéllas: 10,000 a 18,000 Daltons. Además de la arginina, que com-

prende el 13 por ciento, otros residuos básicos incluyen a la lisina y a la histidina. Se han aislado ya varias histonas con distintas composiciones, siendo los principales tipos: a) de alto contenido en lisina; b) de alto contenido en arginina, y c) de bajo contenido en lisina.¹⁰ Sin embargo, todos ellos han demostrado ser heterogéneos y estar integrados por diferentes compuestos.¹¹

Las histonas se encuentran constantemente en los núcleos de los animales superiores y las plantas. En estas últimas han sido menos estudiadas, pero serían similares a las que existen en los vertebrados.¹²

Al igual que las protaminas, las histonas están ligadas al ADN mediante puentes iónicos.¹³ La relación histona:ADN es aproximadamente de 1:1 en la cromatina de gran número de plantas y animales (Tabla 17-2). El nexo entre estos dos componentes puede ser evidenciado citoquímicamente mediante la reacción de Feulgen para el ADN y la del "verde rápido" para las histonas.¹⁴

TABLA 17-2. Composición de la cromatina
(Valores expresados en porcentaje.)

Componente	Hígado ⁵	Embrión de guisante ¹⁵
ADN	31	31
ARN	5	17.5
Histona	36	33
Proteínas ácidas ...	28	18

Más adelante se mencionará el posible papel de las histonas en la regulación de la actividad genética.

Proteínas no histónicas o ácidas

Tanto los núcleos interfásicos como la cromatina (tabla 17-2) contienen abundantes proteínas no histónicas, algunas de las cuales se hallan ligadas al ADN.⁵ Aquellas que no lo están, corresponden a las denominadas *proteínas residuales*, que permanecen como tales aun después de haber sido extraído el resto de las proteínas mediante soluciones salinas (tabla 17-1). Algunas de las proteínas ácidas presentes en el jugo nuclear son bastante solubles, por lo cual pueden perderse en los procesos de aislamiento y purificación.¹⁶ Para impedir dicha pérdida, se utilizan medios de aislamiento no polares.^{17, 18}

La considerable cantidad de proteína no histónica registrada en células metabólica-

mente activas contrasta de manera notable con la composición del espermatozoide, que es mucho menos activo. En éste, el núcleo está compuesto exclusivamente por nucleoproteína o nucleohistona, indicando que las demás proteínas lo han abandonado. El volumen del núcleo es proporcional al contenido de proteínas. Por ejemplo: en neuronas, el núcleo, de gran tamaño, contiene 20 veces más proteínas que la cabeza del espermatozoide.

Las investigaciones recientes tienden a establecer que las proteínas ácidas podrían desempeñar un papel fundamental en el control de la expresión genética, mediante la reactivación de las regiones del genoma enmascaradas por las histonas. Este importante problema será reconsiderado en el capítulo 20. A diferencia de las histonas, las proteínas ácidas tienen una vida media muy corta, hecho que puede correlacionarse con la actividad metabólica de la cromatina.^{19, 20}

Un componente importante de las proteínas ácidas lo constituyen las *fosfoproteínas nucleares* que, en ciertos núcleos, representan del 5 al 10 por ciento de la proteína total. Este componente experimenta rápidas reacciones de fosforilación y desfosforilación, y se encuentra principalmente en la cromatina difusa o activa (eucromatina).^{21, 24} En linfocitos estimulados con fitoaglutininas se observó, junto al aumento de la síntesis de ARN, la fosforilación de las proteínas ácidas.²⁵

Enzimas nucleares

Otras proteínas no histónicas son las enzimas, las más importantes de las cuales intervienen en la síntesis de los ácidos nucleicos. Así, la ADN-polimerasa es capaz de sintetizar ADN utilizando un trozo del original y los trifosfatos de los cuatro desoxirribonucleótidos.²⁶ La ARN-polimerasa puede sintetizar ARN específico o mensajero de los cuatro trifosfatos de ribonucleótido, empleando como modelo al ADN.^{27, 28}

En células de mamíferos, la ARN-polimerasa se halla estrechamente unida al ADN y sólo puede extraerse con soluciones salinas muy concentradas.²⁹ La ADN-polimerasa es más soluble, pero durante la síntesis del ácido se vuelve más ligada a partículas.³⁰ Unidas también al ADN, están la NAD-sintetasa, la nucleósido-trifosfatasa¹⁹ y las histona-acetilinas.

Algunas enzimas relacionadas con el metabolismo

de los nucleósidos se encuentran en alta concentración (por ejemplo, adenosina-diaminasa, nucleósido-fosforilasa y guanasa).

Aunque el núcleo no contiene ni citocromooxidasa ni succinicodehidrogenasa, posee las enzimas solubles de la glucólisis anaerobia, como aldolasa, enolasa, 3-fosfoglicerilaldehído-deshidrogenasa y piruvatoquinasa.³¹

Estos hechos sugieren que en el núcleo celular predomina el metabolismo anaerobio, utilizando la glucólisis como fuente principal de energía. Sin embargo, los núcleos aislados pueden sintetizar ATP por un proceso aerobio, acompañado de la toma de oxígeno.³²

Otros componentes nucleares

En los núcleos existen grandes cantidades de cofactores, moléculas precursoras y minerales. También se encuentran ATP, NAD y acetyl-CoA, al igual que otros nucleósidos, monofosfatos y trifosfatos y productos intermedios de la glucólisis (véase cap. 5).

La distribución de los minerales puede estudiarse con la microincineración. En el espodograma se ve que el núcleo tiene una concentración de cenizas mayor que el citoplasma, y que están compuestas por fósforo, potasio, sodio y, sobre todo, calcio y magnesio. Aparentemente se hallan en mayor proporción en la cromatina. En el núcleo se ha localizado el calcio y el magnesio por medio del microscopio electrónico de emisión.

Es posible que el calcio desempeñe un papel estructural significativo.³³ Por la acción de la enzima desoxirribonucleasa se despolimeriza el 80 por ciento del ADN y al mismo tiempo, el calcio es liberado en cantidades estequiométricas. El hecho de que éste no haya podido separarse por otros medios, sugiere que está combinado con el ADN.

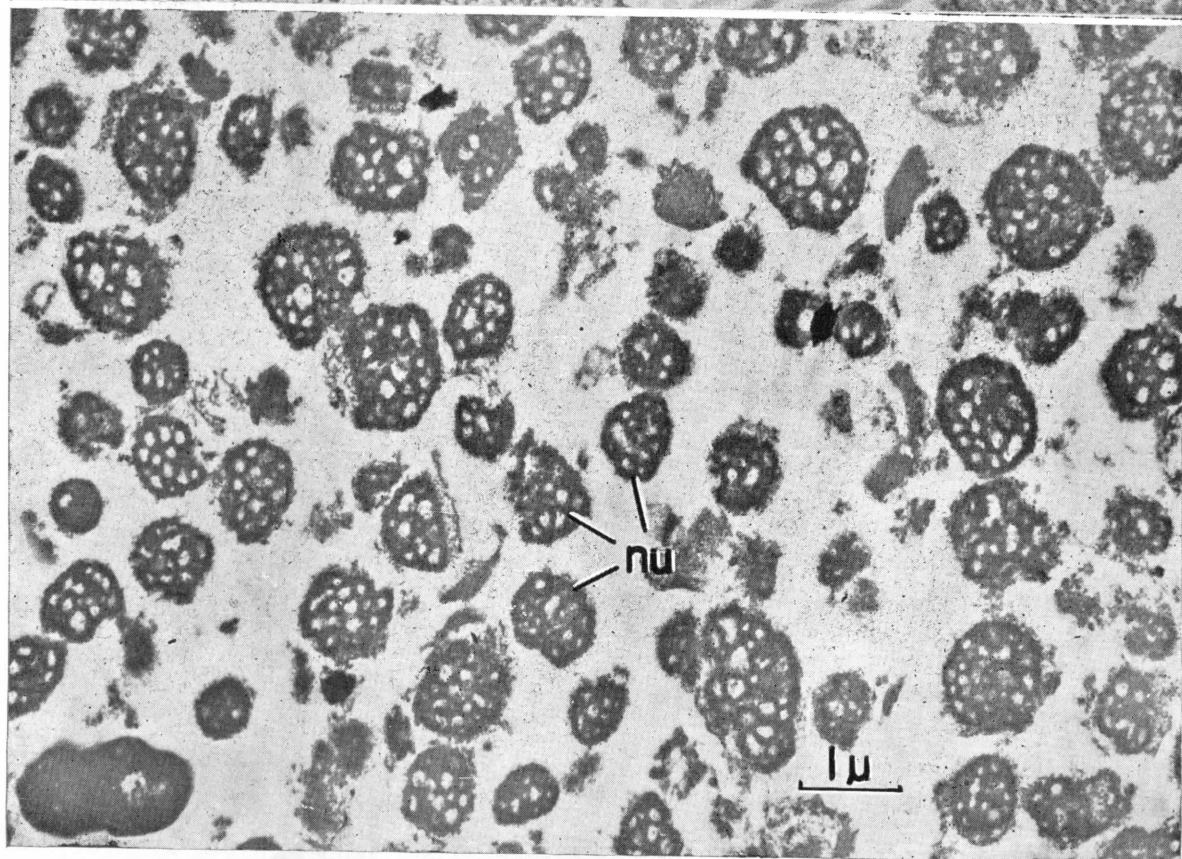
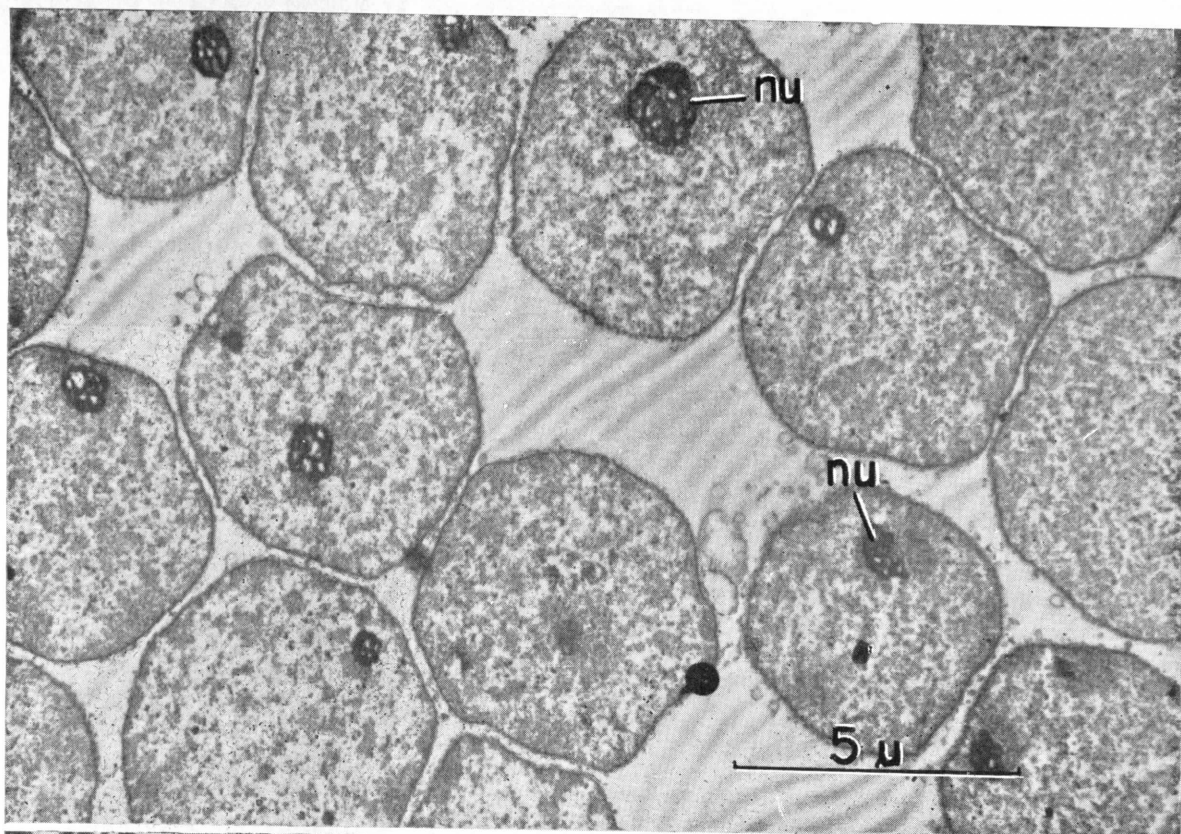
El fosfato se acumula en cantidades apreciables en el nucléolo, donde la existencia de un pool de fosfato fue reconocida por microscopia y difracción electrónicas. Este pool estaría vinculado con el ciclo de condensación cromatínica durante la mitosis.³⁴

En núcleos aislados se investigó el contenido de lípidos.^{35, 36} La coloración directa de los núcleos con los reactivos para lípidos como el sudán negro, da resultados generalmente negativos.³⁷

Contenido en ADN del núcleo

Si el conjunto de cromosomas de una especie posee toda la información genética en el interior de la molécula de ADN, este componente debería ser constante en las células diploides del individuo. El empleo de métodos bioquímicos y citofotométricos en núcleos aislados aportó la primera información de la *constancia del ADN* de la célula.^{38, 39} Por ejemplo, las células diploides de diferentes tejidos de las aves contienen 2,5 picogramos

FIG. 17-2. *Arriba*. Núcleos aislados del hígado de cobayo, observados con el microscopio electrónico. 3000 $\times$. *Abajo*. Nucléolos aislados del hígado de cobayo. *nu* Nucléolos. 16,000 $\times$. (Cortesía de R. Maggio, P. Siekevitz y G. E. Palade.)



(1 pg = 10^{-12} g) de ADN, mientras que el espermatozoide, célula haploide, posee la mitad de dicha cantidad.

Los análisis realizados en diferentes especies de mamíferos demostraron que las variaciones en el contenido en ADN eran pequeñas, aunque características en cada una de ellas. En las distintas especies de aves y peces, el contenido varía en forma más acentuada.^{40, 41}

Entre los invertebrados, los valores de ADN más bajos se observan en los animales más primitivos, como esponjas y celenterados. En los peces, la cantidad de ADN por célula tiende a permanecer constante, dentro de las diferentes especies de una familia.

En los anfibios, el ADN varía entre 168 pg en el *Amphiuma* y 7.33 pg en el sapo.⁴²

Las mediciones en una gran variedad de tipos celulares de una especie determinada, evidenciaron que en la mayoría de los núcleos el contenido de ADN era prácticamente constante.⁴³ Este contenido se halla en relación directa con el número de juegos cromosómicos (n), el cual es de $2n$ en casi todas las células somáticas. Sin embargo, en el hígado hay núcleos grandes que contienen hasta 2 y 4 veces la cantidad de ADN de los núcleos diploides. Esta duplicación o cuadruplicación del contenido en ADN corresponde sin duda a una poliploidía (véase cap. 4 y tabla 17-3).^{43, 44}

TABLA 17-3. Contenido de ADN en picogramos y complemento cromosómico
(De Pollister, Swift y Alfert.⁴⁵)

Células	Término medio ADN-Feulgen	Conjunto de cromosomas atribuidos
Espermátida	1.68	Haploide (n)
Hígado	3.16	Diploide ($2n$)
Hígado	6.30	Tetraploide ($4n$)
Hígado	12.8	Octoploide ($8n$)

Otro ejemplo interesante se encuentra en el estudio de la gametogénesis (tabla 17-4). Precediendo al estado meiótico (véase capítulo 4) existen dos clases de células (espermatogonias) con diferente contenido en ADN ($2n$ y $4n$). El espermatozito primario joven tiene $4n$. Después de la primera división de maduración el espermatozito secundario posee la mitad del contenido en ADN, correspondiendo a $2n$ (diploide). Finalmente, la segunda división de maduración da como resultado 4 espermátidas, que contienen el ADN de un solo juego cromosómico (célula haploide)

de) (tabla 17-4). Resultados similares se observan en la ovogénesis durante la maduración de los ovocitos.⁴⁶

TABLA 17-4. Contenido de ADN en picogramos en diversos estadios de la espermatogénesis
(De Pollister, Swift y Alfert.⁴⁵)

Tipo celular	ADN-Feulgen
Premeiótico { Clase $2n$	3.28 ± 0.07
{ Clase $4n$	5.96 ± 0.07
Espermatozito primario	6.28 ± 0.07
Espermatozito secundario	3.25 ± 0.04
Espermátida	1.68 ± 0.02

Contenido de ADN y longitud de su molécula

Puesto que el ADN constituye una molécula sumamente polimerizada (véase cap. 4), es interesante relacionar su contenido en un núcleo con la longitud de la molécula. Ya hemos descrito el ADN mitocondrial como una molécula circular de aproximadamente 5μ de longitud, el ADN vírico, que puede alcanzar hasta varios micrones (fig. 17-3), y el bacteriano, que llega al milímetro (fig. 17-8). La longitud de la molécula en el caso de los eucariontes es más difícil de determinar, las fibras de ADN aisladas presentan birrefringencia negativa muy intensa y dicroísmo con luz ultravioleta.⁴⁷ Observadas con el microscopio electrónico, aparecen como largas microfibrillas no ramificadas con un diámetro de 20μ (fig. 16-9). Basándose en el modelo de Watson-Crick (fig. 4-13), se sabe que cada nucleótido ocupa $3.4 \text{ \AA}$, y que una vuelta completa de las dos cadenas se compone de 10 de esos nucleótidos ($34 \text{ \AA}$).

En células superiores fueron aisladas fibras de 50 a 90μ de longitud,⁴⁸ y mediante métodos radioautográficos, se verificaron longitudes de ADN de 500μ , en un caso,⁴⁹ y de hasta 1.6 a 1.8 mm , en otro.⁵⁰ Considerando que un picogramo de ADN equivale a 31 cm de éste y que el contenido total por célula es una sola molécula, pueden calcularse, sobre bases teóricas, longitudes de 174 cm de ADN por célula humana diploide (5.6 picogramos), 37 m en *Trillium* (120 pg) y 97 m en cromosomas politénicos de *Drosophila* (293 pg).⁵¹ El contenido de ADN en los 46 cromosomas humanos ha sido determinado citofotométricamente.⁵² De estas mediciones surgió la posible proporcionalidad entre la longitud del cromosoma y su contenido en ADN. Por ejem-

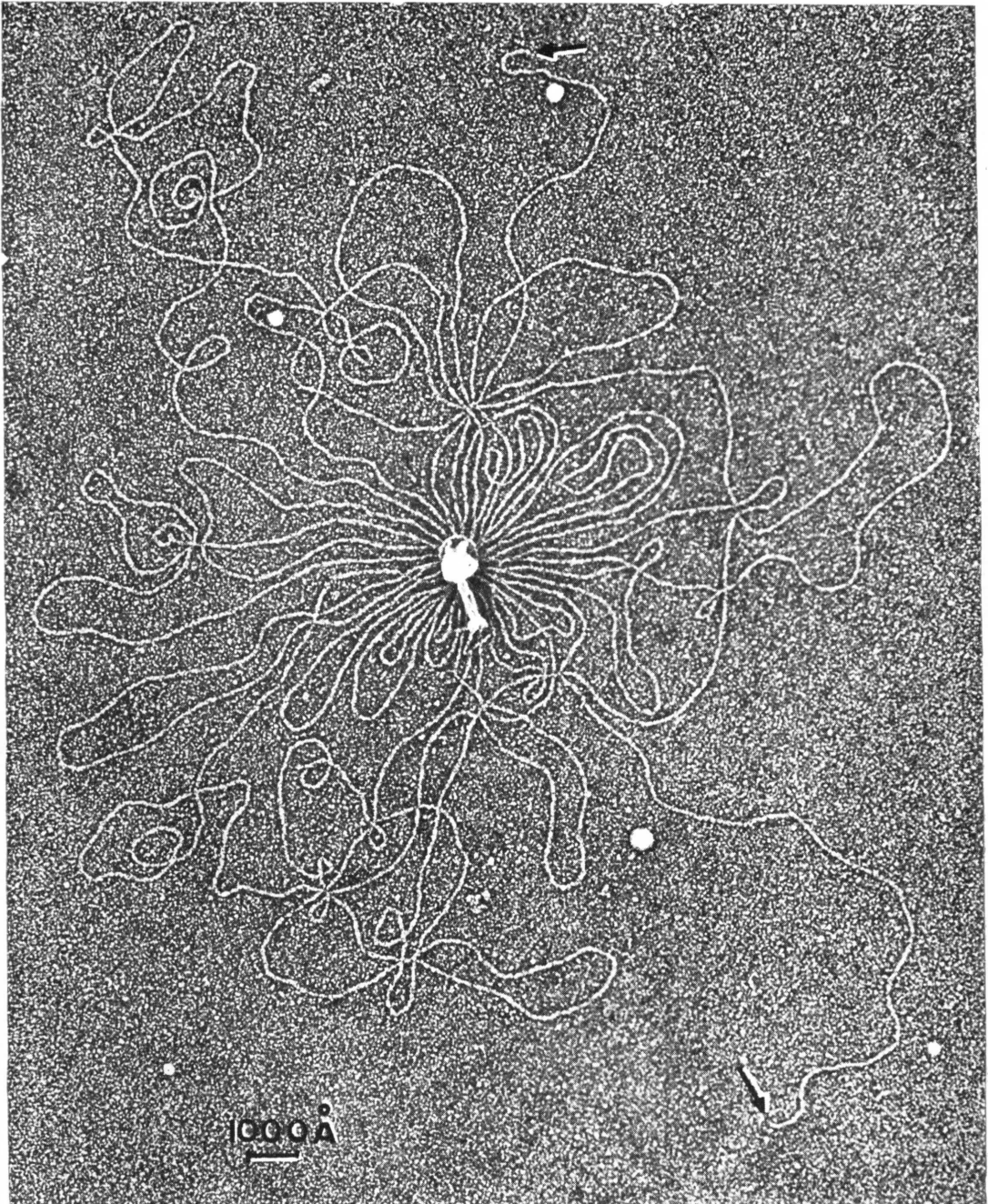


FIG. 17-3. Fotomicrografía electrónica de un bacteriófago (en el centro) que ha experimentado un shock osmótico. La molécula de ADN que se hallaba contenida en la "cabeza" del bacteriófago ahora está dispersa. Se indican con flechas los extremos de la única molécula no ramificada de ADN. Preparación sombreada con platino, 76,000 $\times$. (Cortesía de A. K. Kleinschmidt.)

plo, el cromosoma del primer par, que mide 10 μ de longitud, debería contener en forma sumamente apretada 7.2 cm de ADN.

Duplicación del ADN y ciclo vital de la célula

El empleo del análisis citofotométrico y de la radioautografía con precursores marcados, permitió investigar la síntesis del ADN en relación con el ciclo celular. Éste puede dividirse en un período mitótico y otro intermitótico (interfase), de duraciones variables según los tipos celulares (tabla 17-5). Las mediciones del contenido de ADN pusieron de manifiesto que su síntesis ocurría solamente en una etapa restringida de la interfase (el denominado período S), precedida por otros dos períodos, G_1 y G_2 , en los cuales no tenía lugar (fig. 17-4).

Una experiencia típica consiste en colocar células en cultivo durante 10 minutos en presencia de timidina marcada con tritio (H_3), nucleósido que sólo existe en la molécula de ADN. Luego el cultivo es lavado por completo y las muestras son fijadas para estudios autorradiográficos con intervalos de 1-2 horas durante 24 horas. En estas experiencias los primeros cromosomas mitóticos marcados aparecen después de 4 horas. Ello indica que el período G_2 tiene esa duración aproximada. La proporción de divisiones marcadas permite, en este caso particular, calcular un período S de 8.5 horas y uno G de 4 horas.⁵⁴

Investigaciones más recientes demuestran no obstante, que existe en algunas células una pequeña síntesis de ADN en el G_2 y en la profase.⁵⁵⁻⁵⁷ Dicha síntesis parece ser particularmente importante en la meiosis (véase más adelante).

Durante todo el período de crecimiento y

duplicación, el cromosoma participa por lo menos en tres actividades diferentes: a) en su reduplicación; b) en la transferencia de información genética al resto de la célula y c) en el ciclo de arrollamiento y desenrollamiento que está asociado con la separación de los cromosomas duplicados o cromátidas hijas (véase cap. 3 y fig. 3-7). Las funciones a y b (duplicación y transmisión de información) ocurren probablemente en el momento en el que los cromosomas se encuentran en el estado de mayor dispersión (desenrollados).

Asincronismo en la duplicación del ADN. Diversos estudios han probado que en el período S la síntesis del ADN puede ser asincrónica, y que uno o más cromosomas homólogos son susceptibles de duplicarse en un

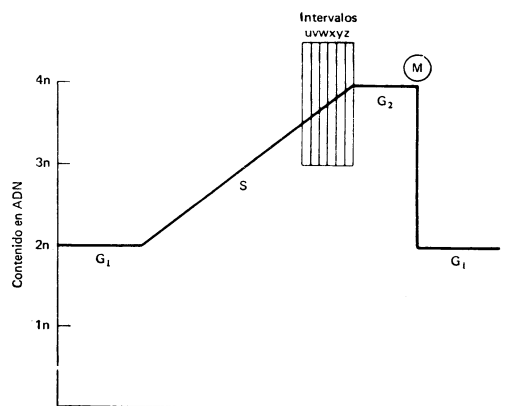


FIG. 17-4. Esquema que representa el ciclo celular y la variación del ADN. El período sintético (S) puede ser subdividido en intervalos menores que corresponden a la duplicación de cada cromosoma (u - z). M Mitosis. (De J. German, 1964.)

TABLA 17-5. Períodos mitóticos e intermitóticos en diversos tipos celulares (De Mazia, 1961.⁵⁸)

Célula	Tiempo en minutos	
	Intermitótico	Mitótico
Meristema de raíz de <i>Vicia fava</i> (19°C)	1,300	150
	1,400	186
Meristema de raíz de <i>Pisum sativum</i> (guisante) ...	1,350	177
Fibroblastos de pollo (38°C)	660 - 720	23
Cultivos de bazo de ratón	480 - 1,080	43 - 90
Yeyuno de rata (en el animal)	2,000	28
Sarcoma Jensen de rata (en el animal)	720	27
Epitelio corneal de rata (en el animal)	14,000	70
Neuroblastos de <i>Chrotophaga</i> (saltamontes)	27	181
Huevo de <i>Drosophila</i>	2.9	6.2
<i>Psammechinus</i> (huevo de erizo de mar), estadio de 2-4 células (16°C)	14	28

momento que precede o sigue a la duplicación de los restantes. Esto se denomina *asincronismo dentro del conjunto cromosómico*. En otros casos se duplican partes de un solo cromosoma en diferentes momentos que las otras, constituyendo el *asincronismo intracromosómico*.

En células en cultivo del hámster,⁵⁹ 5 ó 6 cromosomas tienen segmentos que se duplican tardíamente. Entre éstos, el cromosoma Y en su totalidad y la rama larga del X se duplican en la última mitad del período S, mientras que la rama corta lo hace en la primera mitad del período S (fig. 17-12).^{60, 61} También se ha observado asincronía en la duplicación del ADN en cromosomas humanos (figura 17-4).⁶² Un cromosoma X y los pares más grandes son los de duplicación más tardía.

Este asincronismo explica la diferente vulnerabilidad de ciertos cromosomas individuales a lesiones producidas por agentes químicos que afectan la síntesis del ADN. La 5-fluordesoxiuridina (FUDR), que es un inhibidor de la timidilato-sintetasa, actúa durante el período S y produce efecto sobre el cromosoma que se está duplicando en ese momento.⁶³

Mecanismo molecular de la duplicación de ADN. La organización estereoquímica de la molécula de ADN fue estudiada en el capítulo

4, junto con la descripción del modelo de Watson y Crick. El lector recordará que dos de los componentes del ADN (ácido fosfórico y desoxirribosa) son constantes, y que la información genética está codificada únicamente en la secuencia de las cuatro bases. El "diccionario" genético tiene un "lenguaje" de sólo cuatro unidades. La extraordinaria cantidad de información que puede ser registrada se debe al alto grado de polimerización de esta molécula, cuyo tamaño se mide en milímetros y aun en centímetros. El mecanismo de la duplicación del ADN sugerido por Watson y Crick, en 1953, implica el desenrollamiento de las dos cadenas de polinucleótidos y la copia de dos nuevas cadenas complementarias por medio del mecanismo del moldeado (fig. 17-5) en el que cada cadena actúa como un molde de la nueva molécula sintetizada. Cada molécula de ADN se duplica sólo una vez en el curso de su ciclo, y el estímulo inicial para la síntesis de ADN podría ser el desenrollamiento de la doble hélice en un punto determinado de la molécula. El mecanismo sería puesto en acción simplemente por medio de la separación de las dos cadenas de ADN, los nucleótidos complementarios se colocarían en fase y se unirían en presencia de ADN-polimerasa (fig. 17-5).

Estando unidas por puentes de hidrógeno

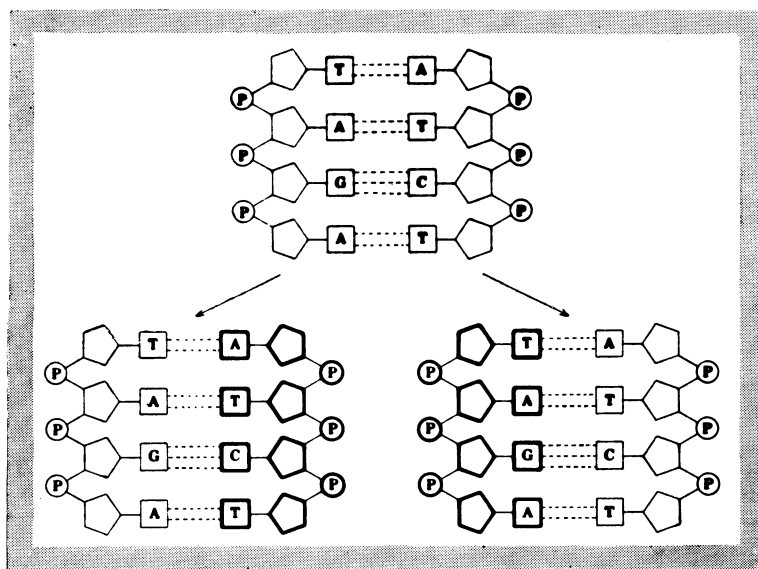


FIG. 17-5. Esquema del mecanismo de duplicación del ADN. Arriba. Las dos moléculas progenitoras se separan por ruptura de las uniones de hidrógeno. Abajo. Las dos nuevas cadenas que se han sintetizado y que poseen una composición de bases complementarias respecto de las cadenas progenitoras, están indicadas con líneas más oscuras. (De Kornberg.)

relativamente débiles, las cadenas de polinucleótidos se separan sin intervención de mecanismos enzimáticos. El problema del desenrollamiento (hay alrededor de 1000 vueltas en 3.4μ de ADN) puede simplificarse, si se considera que el desenrollamiento y el enrollamiento del ADN son susceptibles de producirse simultáneamente.⁶⁵

La duplicación puede esquematizarse por

una "horquilla" que forma una Y con las cadenas progenitoras originales (fig. 17-6).

Otra dificultad que ofrece la duplicación del ADN proviene del hecho de que la ADN-polimerasa actúa sólo en el sentido 5' - 3' (recuérdese del capítulo 4 que ambas cadenas son complementarias y con una disposición antiparalela). Cuando las dos cadenas se desenrollan, una tiene un extremo 3' y la otra

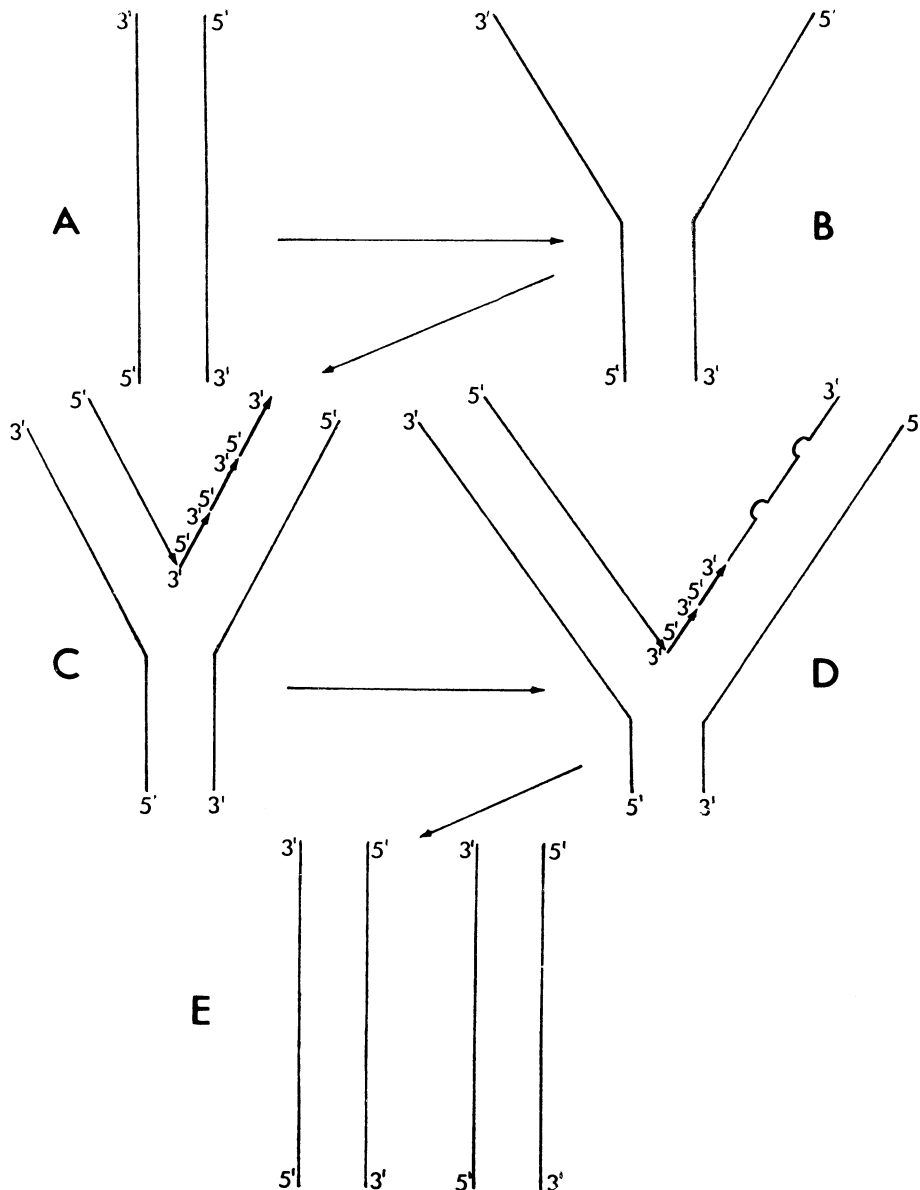


FIG. 17-6. Duplicación del ADN utilizando la ADN-polimerasa. La cadena que termina en 5' se duplica en forma continua; en cambio, la que termina en 3' lo hace por una serie de fragmentos que luego se sueldan entre sí.

uno 5'. Hay evidencias recientes que la solución de este problema sería la síntesis (en la cadena que finaliza en 5'), de cortos trozos de ADN en la dirección 5'--3', que luego se unirían (fig. 17-6).

Síntesis *in vitro* de un cromosoma de bacteriófago. Es importante mencionar al respecto que en diciembre de 1967 se realizó la primera síntesis *in vitro* de un cromosoma virósico completo.⁶⁶ El bacteriófago Q $\times$ 174 tiene un cromosoma circular formado por una cadena única de ADN con alrededor de 6000 nucleótidos e información suficiente para codificar de 6 a 7 proteínas. Usando esa molécula como molde, y sólo con el agregado de ADN-polimerasa y ADN-ligasa (enzima que cata-

liza la forma circular de la molécula de ADN ligando los extremos 3' y 5' mediante una unión fosfodiéster), fue posible sintetizar una molécula completamente nueva de ADN, capaz de infectar células bacterianas.

La duplicación del ADN es semiconservadora. El modelo de Watson y Crick sugiere asimismo que la duplicación es semiconservadora, o sea que la mitad del ADN se conserva y la mitad se sintetiza (fig. 17-7).

Existen muchos ejemplos que confirman esta presunción. Si la bacteria *Escherichia coli* crece en un medio con N¹⁵ y luego es trasferida a otro con N¹⁴ y el ADN se aísla, determinándose su densidad mediante ultracentrifugación en gradientes de CICs, se com-

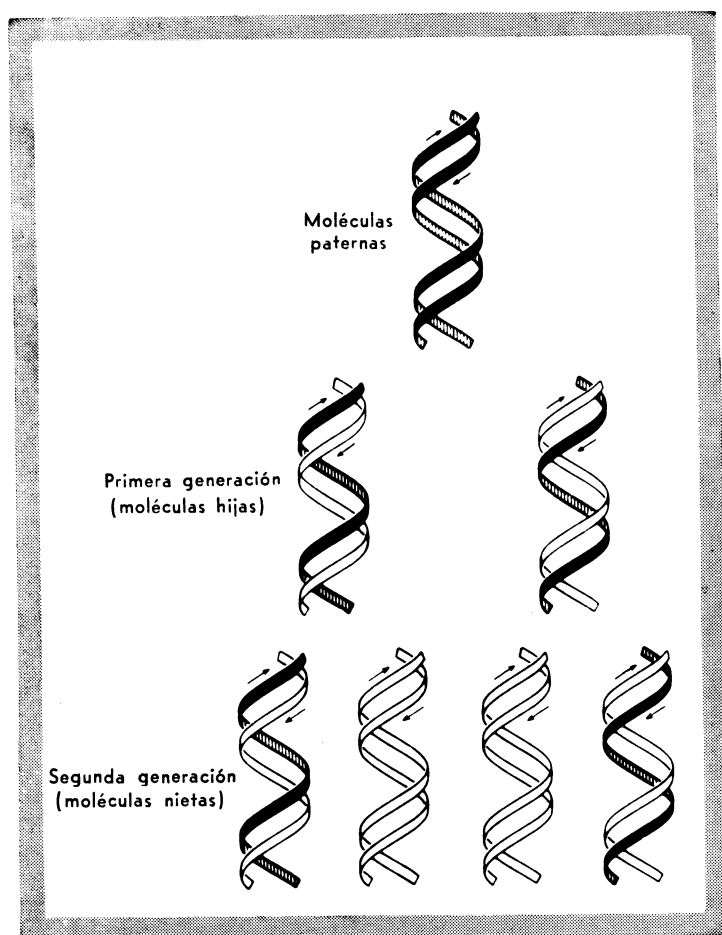


FIG. 17-7. Esquema que interpreta el experimento de Messelson y Stahl descrito en el texto. Arriba se indica la molécula progenitora de ADN, en la que ambas cadenas están marcadas con N¹⁵. La primera generación comprende las moléculas hijas (en blanco) sintetizadas en un medio que contiene N¹⁴ (véase que las moléculas de ADN son híbridas formadas por cadenas con N¹⁵ y N¹⁴). En la segunda generación (moléculas nietas), dos moléculas son híbridas y dos no lo son.

prueban los resultados que siguen: después del primer ciclo de división se advierte un solo pico de ADN correspondiente a la molécula híbrida (esto es, con una cadena marcada con N^{14} y la otra con N^{15}); en la segunda generación (como en la ley de Mendel,

véase cap. 15) aparecen dos picos, en uno de los cuales las dos cadenas de ADN contienen N^{14} y el otro corresponde a la molécula híbrida (fig. 17-7).

En la misma bacteria se demostró de manera elegante la duplicación semiconservado-

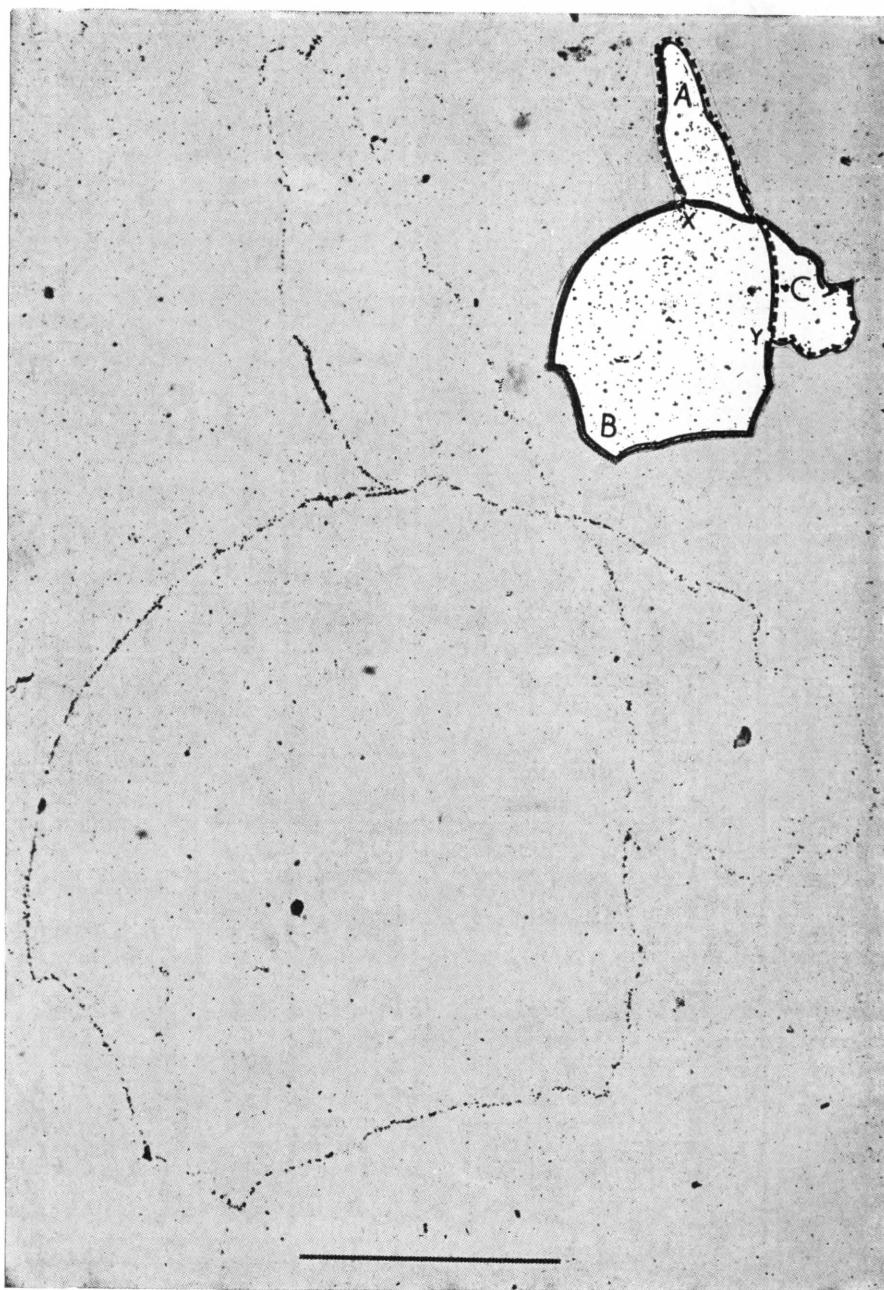


FIG. 17-8. Autorradiografía, observada con el microscopio óptico, de un cromosoma de *E. coli* marcado con timidina tritiada por dos generaciones. La bacteria ha sido lisada suavemente y se observa el cromosoma entero duplicándose.

ra del ADN, tanto en el nivel molecular como en el celular.⁶⁸ A diferencia de lo que ocurre con las células de los organismos superiores, en *E. coli* la síntesis de ADN es casi continua y éste se divide sin interrupción cada 20 ó 30 minutos en las colonias de rápido crecimiento. Después del tratamiento con timidina H³ pudo establecerse, utilizando un método autorradiográfico especial: a) que el cromosoma está constituido por una sola molécula circular de ADN formada por 2 cadenas, de 1 mm de largo (fig. 17-8); b) que la duplicación comienza en un punto fijo del círculo y prosigue desde allí en una sola dirección (figura 17-9), y c) que en el punto de duplicación, las dos cadenas progenitoras se separan y las moléculas hijas se colocan alineadas a un lado.

Durante todo el período de duplicación las moléculas hijas permanecen adheridas al extremo final de la molécula original. Finalmente, las dos moléculas circulares de ADN

se separan y comienza un nuevo ciclo (figura 17-9).

Es sumamente interesante destacar que el proceso total de duplicación del ADN en la *E. coli* ocurre en 20 a 30 minutos, debido a lo cual la molécula se debe desenrollar a la extraordinaria velocidad de 10.000 revoluciones por minuto.

Duplicación del ADN en eucariontes. La duplicación semiconservadora del ADN había sido demostrada previamente en células de vegetales superiores.⁶⁹ Estas crecieron primero en un medio con timidina radiactiva y luego en un medio normal. Se observó que los núcleos que estaban en la fase de síntesis incorporaban el marcador, mientras que aquellos que habían completado la duplicación del ADN no resultaban marcados. Con la finalidad de detener la mitosis se utilizó la colchicina. Esta droga inhibe la división celular sin impedir la duplicación cromosómica, posibili-

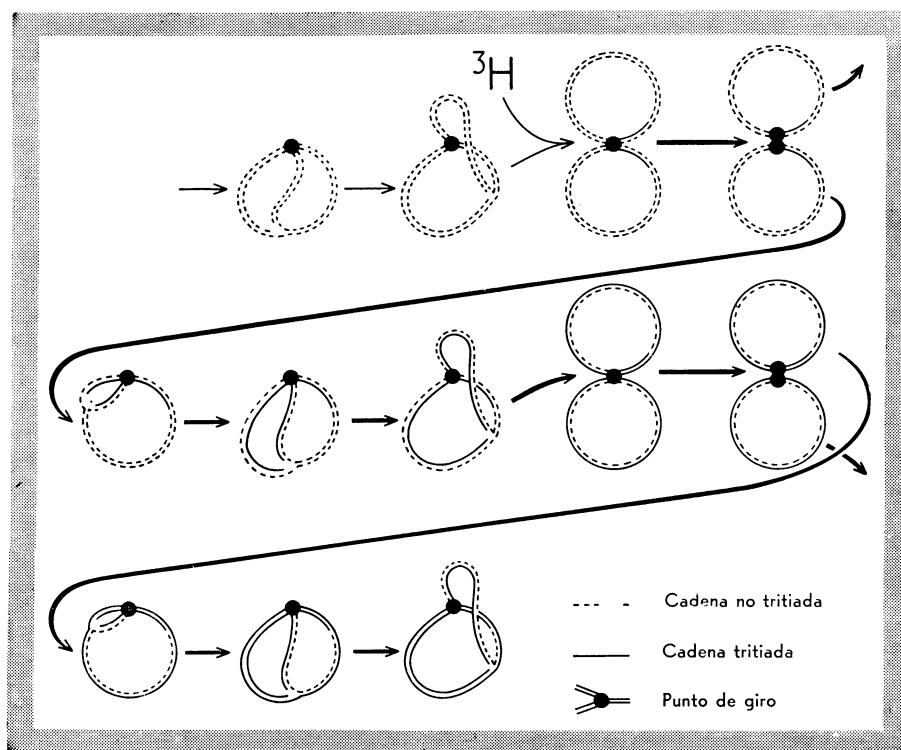


FIG. 17-9. Esquema que interpreta el experimento de Cairns (fig. 17-8). En el punto ^3H se agrega la timidina radiactiva y comienza la síntesis de cadenas marcadas a partir del punto de giro. Se supone que éste se divide al completarse la duplicación del ADN circular. En la segunda generación se llega a un estadio que podría corresponder al de la autorradiografía de la figura 17-8, en el cual se supone que X corresponde al punto de giro. (Cortesía de J. Cairns.)

tando de tal modo el agrupamiento en la misma célula de los cromosomas originados en la primera y segunda generación (poliploidía).

En la figura 17-10 se resume la interpretación de estos resultados. La conclusión es que antes de su duplicación cada cromosoma es doble y se comporta como si estuviera constituido por dos unidades de ADN en toda su extensión. En el momento de la duplicación (período S), se construyen dos nuevas unidades (ahora marcadas) al costado. Entonces, cada cromátida hermana incluye una cadena original no marcada y una nueva radiactiva. Cuando ocurre la segunda duplicación, en ausencia de un precursor marcado, las cadenas se separan y el resultado es la formación de dos cromátidas hijas, una marcada y otra no.

En el caso antes mencionado de la *E. Coli*, la velocidad de la duplicación del ADN se calcula en 20 a 30 μ por minuto; en células tumorales HeLa parece ser menor: alrededor de 0.5 μ por minuto,⁷⁰ y en cromosomas de hámster, se ha estimado en 2 μ por minuto.

A esta velocidad y teniendo sólo una zona

de duplicación, en un período S de 10 horas podrían duplicarse únicamente 1.200 μ de ADN. Por esa razón, en cromosomas de células superiores, la síntesis de ADN debe iniciarse en varios sitios de la molécula al mismo tiempo. El número de "horquillas", lugar de dicha síntesis, probablemente dependa de la longitud total del ADN del cromosoma. Mediante radioautografía, después de un pulso de marcado, se comprobó que el ADN cromosómico se duplica en secciones menores que 30 μ de largo, dispuestas en serie una después de la otra. En las células del hámster la duplicación se lleva a cabo aparentemente en direcciones opuestas en dos segmentos adyacentes, cada uno de los cuales corresponde a un punto de crecimiento "en horquilla".⁷¹ En cromosomas politénicos de *Drosophila* en duplicación, tratados con timidina H³ por cortos períodos la marcación aparece independientemente en diferentes sitios en cada cromosoma y prosigue en una secuencia definida. El orden de los sucesos en la duplicación es coordinado y una vez que se inicia en una región, debe continuar hasta completarse.⁷²

ESTADIO	AUTORRADIOGRAFÍA	
	OBSERVADA	INFERIDA
Pre-replicación		
Replicación en timidina tritiada		
Metafase C X_1 Anafase C		
Replicación sin timidina tritiada		
Metafase C X_2 Anafase C		

FIG. 17-10. Esquema que interpreta el experimento de Taylor y colaboradores.⁶⁹ En la autorradiografía las líneas quebradas corresponden a los filamentos cromosómicos marcados. (De K. L. Lewis y B. John.)

Síntesis de ADN en la meiosis

Como se mencionó en el capítulo 13, la meiosis se caracteriza esencialmente por el apareamiento de cromosomas homólogos y el *crossing-over*, con la consecuente recombinación de las cromátidas. En años recientes, pudo comprobarse que el comportamiento especial de los cromosomas meióticos se acompaña de diferencias en la síntesis de ADN.

En una célula lista para entrar en mitosis, todo el ADN se ha duplicado en el período S, antes del G₂. En una célula que entra en meiosis, la duplicación premeiótica del ADN alcanza al 99.7 por ciento del total; la síntesis restante ocurre en la profase meiótica.⁵⁶

En microporocitos de *Trillium* se observó que al comienzo del cigoteno, en coincidencia con la formación del complejo sinaptonémico (véase cap. 16) y del apareamiento cromosómico, hay una duplicación retrasada de ADN. Otra pequeña duplicación adicional tiene lugar en el paquiteno. La figura 17-11 evidencia que los ADN-s sintetizados en el cigoteno y paquiteno tienen una densidad de flotación ligeramente diferente de la del ADN producido en mayor cantidad en la interfase.⁵⁷

Durante el cigoteno, usando inhibidores de la síntesis de ADN, el apareamiento se detiene y el complejo sinaptonémico no se forma⁷³ (véase cap. 16). En este mismo período ocurre también una síntesis característica de proteínas, cuya inhibición, por dosis bajas de cicloheximida, produce detención del apa-

reamiento y disminución de la síntesis de ADN.⁷⁴

La existencia de una pequeña síntesis de ADN durante la meiosis provee evidencias bioquímicas para explicar el mecanismo de los quiasmas y del *crossing-over*. Se cree que esa síntesis es fundamentalmente aprovechada en la reparación de las moléculas de ADN rotas en dichos procesos. La inducción de quiasmas en el paquiteno incluye por lo menos la acción de dos enzimas: a) una endonucleasa para cortar la cadena de ADN, y b) una del tipo de la ligasa para restaurar la unión. Estas dos enzimas se identificaron en células meióticas, comprobándose que la actividad de la nucleasa aumenta durante el paquiteno.⁵⁷ De estos estudios se desprende que el apareamiento de cromosomas homólogos requiere la síntesis del ADN para completar la duplicación, mientras que en el *crossing-over* aquélla es necesaria para la reparación de los cromosomas.

ARN nuclear y el origen del ARN citoplásmico

Los estudios sobre el ADN cromosómico, empleando precursores marcados, pusieron de manifiesto que la segregación es semiconservadora entre las cromátidas, y que el ADN marcado es permanente, persistiendo durante varias generaciones celulares. Éste es otro punto importante por recordar: *la molécula de ADN es muy estable* y su principal fun-

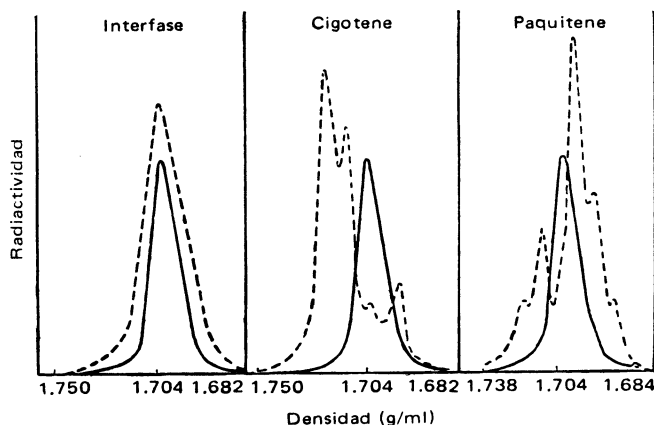


FIG. 17-11. ADN de células de trigo en meiosis estudiado por ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. Obsérvese que la densidad de flotación del ADN sintetizado en el cigoteno es diferente de la de la interfase y del que se sintetiza en el paquiteno. (Cortesía de H. Stern y Y. Hotta.)

ción consiste en el almacenamiento de la información genética. Nosotros veremos ahora que el ARN nuclear se comporta de manera distinta.

Cuando se suministra a una célula un precursor radiactivo de ARN, éste se incorpora primero al núcleo y luego aparece en el citoplasma, interpretándose que la síntesis de ARN se produce en el núcleo y que luego la molécula es transferida al citoplasma. Por ejemplo, si el protozooario *Tetrahymena* es incubado entre 1.5 y 12 minutos con citidina- H_3 , toda ella aparece en el núcleo (fig. 17-12, A). Después de 35 minutos, tanto el núcleo como el citoplasma contienen idéntica cantidad (fig. 17-12, B). Finalmente, si a la célula se le da citidina tritiada por pocos minutos y luego es incubada en un medio no radiactivo, durante un largo período el citoplasma aparece marcado, pero no así el núcleo (fig. 17-12, C).

En el mismo organismo, la citidina se incorpora al fragmento nucleado y, en cambio, no lo hace en un fragmento anucleado. Ello revela el origen nuclear del ARN citoplásmico.⁷⁵

Estudios similares realizados en células en división ponen de manifiesto que, mientras en la interfase el núcleo concentra más ARN marcado que el citoplasma, en la profase tardía casi todo el ARN nuclear (incluyendo el ARN nucleolar) es transferido al citoplasma y los cromosomas metafásicos lo contienen en escasa proporción.⁶⁰

Tipos de ARN que intervienen en la transcripción genética y la síntesis proteica

El estudio de los ARN-s nucleares y citoplásmicos ha cobrado importancia por el papel que se les reconoce en la transcripción genética (fig. 17-1) y en la síntesis proteica. Las primeras investigaciones se efectuaron en bacterias, debido a lo cual el conocimiento de las especies de ARN es más completo en esos organismos. En las células superiores estos ácidos nucleicos presentan mayor complejidad y han sido poco estudiados.

Se reconocen tres tipos de ARN en bacterias: ARN mensajero (ARN-*m*), ARN de transferencia (ARN-*t*) y ARN ribosómico (ARN-*r*); todos los cuales son codificados sobre la molécula de ADN cromosómica. El ARN-*r* será estudiado en detalle en el capítulo 18, y las variedades de transferencia y mensajero, en el capítulo 19.

ARN en células eucariontes. Las células superiores, además de los ARN-s antes mencionados, contienen otros tipos que vuelven más dificultoso su reconocimiento. En el capítulo 18 se mencionarán las diferentes clases de precursores de ARN-*r* (45 S, 41 S, 36 S, 32 S, etcétera), que se encontraron en nucléolos aislados.

ARN nucleoplásmico heterogéneo. En núcleos aislados se identificó un ARN heterogéneo con valores de S que oscilan entre 10 y 90.^{2, 76, 77} Su composición de bases es semejante a la del ADN y se hibridiza rápidamente con él. Se presenta en su mayor par-

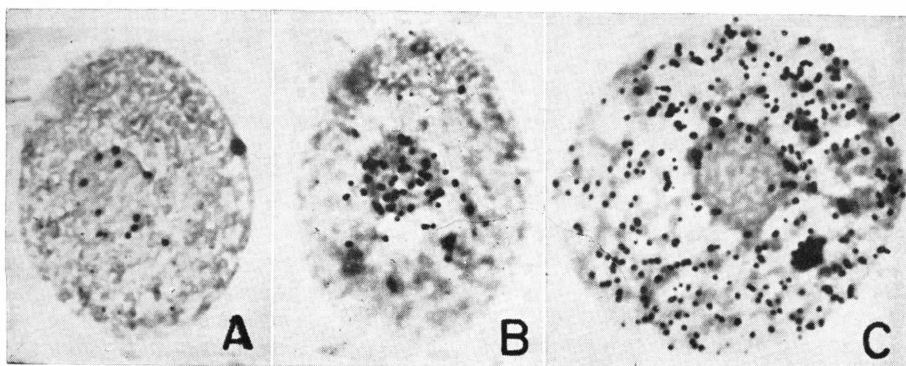


FIG. 17-12. Autorradiografía de una *Tetrahymena* incubada en citidina H_3 durante 1,5 minuto. Todo el ARN marcado se halla restringido al núcleo. B Lo mismo después de 15 minutos. El ARN comienza a entrar en el citoplasma. C Lo mismo, incubado en citidina H_3 durante 12 minutos y luego por 88 minutos en un medio no radiactivo. Véase que mientras el núcleo ha perdido todo el ARN marcado, el citoplasma se encuentra intensamente marcado. (Cortesía de D. M. Prescott.)

te en el nucleoplasma, fuera del nucléolo.^{78, 79} Puesto que la síntesis del ARN-r puede suprimirse específicamente usando dosis bajas de actinomicina (véase cap. 18), es factible recurrir a esta técnica para reconocer el ARN nucleoplásmico heterogéneo y otros tipos de ARN en células superiores.⁷⁹ (La alta sensibilidad del ARN ribosómico para la actinomicina D se debe aparentemente al contenido elevado de guanina.)

El ARN nucleoplásmico tiene un intercambio muy rápido, con una vida media de una hora. Esta fracción es sintetizada y degradada rápidamente dentro del núcleo.⁸⁰ Aunque su función resulta todavía desconocida, no se encuentra aparentemente relacionado con la síntesis proteica y permanece en el nucleoplasma; puede considerarse como un ARN asociado con la cromatina.

Algunos ARN-s nucleoplásmicos se encuentran integrando partículas ribonucleoproteicas de 40 S, que fueron aisladas de núcleos de hepatocitos. Dichas partículas tienen 11 por ciento de ARN y 89 por ciento de proteí-

nas, y no corresponden a subunidades ribosómicas.⁸¹ La localización ultraestructural de ribonucleoproteínas en los núcleos de las células superiores es susceptible de ser estudiada mediante microscopía electrónica (véase cap. 16).⁸² Las ribonucleoproteínas fibrilar y granular del nucleoplasma podrían corresponder al ARN nucleoplásmico heterogéneo antes mencionado, en tanto que los gránulos pericromatínicos representarían grandes moléculas de ARN-m. Cuando estos gránulos son transportados al citoplasma, a través de los poros nucleares, experimentan cambios de configuración consistentes en su transformación en fibrillas de RNP.

ARN citoplásmico heterogéneo. Además del verdadero ARN-m, vinculado con los polirribosomas, hay un ARN citoplásmico heterogéneo asociado predominantemente a las membranas.⁸³ Como se observa en la figura 17-13, este tipo de ARN sedimenta junto con el ARN-m. Sin embargo, usando EDTA, un agente que extrae los cationes bivalentes, es posible separarlo del verdadero ARN-m.⁷⁹ El ARN asociado a membranas estaría codificado por el ADN mitocondrial, y sería empleado en parte por las mitocondrias para la síntesis proteica.⁸⁴ Se han aislado dos ARN-s mitocondriales de 12 S y 21 S (Vesco y Penman, 1969).

Proteínas en el ciclo vital de la célula

El estudio del ciclo de las proteínas con aminoácidos marcados (leucina- H^3 , histidina- H^3 , lisina- H^3 , prolina- H^3) revela que los cromosomas metafásicos poseen pequeñas cantidades de proteínas, mientras que inmediatamente antes hay una liberación masiva de éstas en el citoplasma.

Las histonas, lo mismo que otras proteínas nucleares, se sintetizan continuamente durante la interfase. Un hecho importante, que se produce en la telofase tardía, es el retorno de algunas proteínas marcadas del citoplasma al núcleo. En núcleos de amebas se han identificado dos clases de proteínas nucleares:⁸⁵ una de ellas emigra continuamente entre el núcleo y el citoplasma, y la otra parece ser no migratoria y permanece en el núcleo. Durante la mitosis, son vertidas al citoplasma y retornan al núcleo cuando la división de éste ha terminado. El sitio de síntesis de ambos tipos de proteínas nucleares parece ser, al menos en parte, el citoplasma. Estos descubrimientos son de gran interés en el problema de las relaciones nucleocitoplásmicas y de la naturaleza de los agentes que pueden llevar mensajes del núcleo al citoplasma y viceversa (véase capítulo 20).^{86, 87}

En ciertas enfermedades humanas, como el lupus diseminado, se producen autoanticuerpos contra cier-

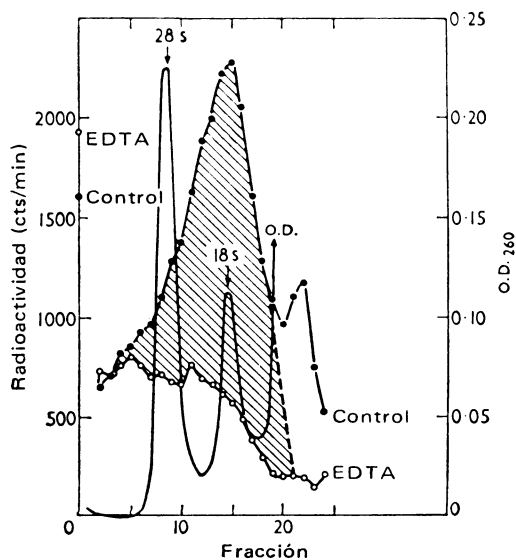


FIG. 17-13. Esquema de ultracentrifugación del ARN-s que sedimenta en el extracto citoplásmico de células HeLa. Estas células fueron tratadas con una pequeña dosis de actinomicina D, que inhibe la síntesis del ARN-r, y luego se las marcó con uridina H^3 por 60 minutos. Los ARN-r 28 S y 18 S sirven para distinguir al ARN heterogéneo citoplásmico, fracción que sedimenta con la misma velocidad que los polirribosomas. La porción que queda después del tratamiento con EDTA (que rompe los polirribosomas) indica el ARN asociado a las membranas. La zona sombreada corresponde al verdadero ARN polirribosómico (mensajero). (De S. Penman, C. Vesco y M. Penman.)

tos componentes de sus propias células. Si esos anticuerpos son marcados por medio de un colorante fluorescente, pueden servir para localizar el antígeno intracelular (véase cap. 6). Con este método se ha obtenido un anticuerpo contra la desoxirribonucleoproteína que colorea al cromosoma. Además existen otros dos antígenos en el núcleo: uno que pertenece a la proteína soluble y el otro a un componente del nucleólo. Durante la división celular los dos antígenos penetran en el citoplasma y vuelven al núcleo en el momento de la telofase.⁸⁷

En células cultivadas se ha verificado que la fracción principal de histonas presente en los cromosomas no se disocia durante los ciclos mitóticos sucesivos (Hancock, 1969).

En relación con el ciclo de las proteínas nucleares, hay observaciones que indican que durante la espermiogénesis (en el saltamontes) existe un reemplazo de la histona por otra más semejante a la protamina, esto es, más rica en arginina y más básica. Los estudios con aminoácidos marcados (arginina-³H) demuestran que esta proteína básica se sintetiza en el citoplasma a expensas del complejo ribosómico (véase cap. 9) para pasar seguidamente al núcleo donde se combina con el ADN.⁸⁸

Un punto interesante que está siendo examinado en cultivos sincronizados de células de levadura es el modelo de síntesis de proteínas individuales, particularmente de algunas enzimas como las fosfatasa alcalina y ácida, y la sacarasa.⁸⁹

Cada enzima aparece en un momento definido del período G₂, después de la duplicación del ADN, y presenta además un perfil cuantitativo característico. Puesto que estas enzimas representan la traducción final del código genético (fig. 17-1), la transcripción a los ARN-m debe ocurrir mucho antes. El período de retraso se puede investigar usando inhibidores de la transcripción ADN → ARN, como la actinomicina D. Sin embargo, dicho retraso podría deberse al tiempo que implica el transporte de ARN-m del núcleo al citoplasma.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Anfinsen, C. B.: (1959) *The chemical basis of evolution*. John Wiley & Sons, New York.
- Benzer, S.: (1962) The fine structure of the gene. *Scient. Amer.*, 206:70.
- Brachet, J.: (1957) *Biochemical cytology*. Academic Press, New York.
- Chargaff, E. and Davidson, J. N.: (1955) *Nucleic acids*. Academic Press, New York.
- Crick, F. H. C.: (1957) Nucleic acids. *Scient. Amer.*, 197:188.
- Davidson, J. N.: (1960) *The biochemistry of the nucleic acids*. 4th ed. John Wiley & Sons, New York.
- McElroy, W. D. and Glass, B. (eds.): (1957) *The chemical basis of heredity*. Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Mirsky, A. E.: (1968) The discovery of DNA. *Scient. Amer.*, 218:78.
- Mitchel, J. S. (ed.): (1960) *The cell nucleus* (Symposium). Academic Press, New York.
- Parchman, L. G. and Stern, H.: (1969) The inhibition of protein synthesis in meiotic cells and its effect on chromosome behavior. *Chromosoma*, 26: 298.

- Struss, B. S.: (1960) *An outline of chemical genetics*. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Taylor, J. H.: (1958) The duplication of chromosomes. *Scient. Amer.*, 198(6):36.
- Vesco, C. and Penman, S.: (1969) The cytoplasmic RNA of HeLa cells. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 62:218.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Avery, O. T., McLeod, C. M. and McCarthy, M.: (1944) *J. exp. Med.*, 79:137.
2. Penman, S., Smith, J., Holtzman, E. and Greenberg, H.: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:489.
3. Mirsky, A. E. and Pollister, A. W.: (1946) *J. gen. Physiol.*, 30:117.
4. Maio, J. J. and Schildkraut, C. L.: (1967) *J. molec. Biol.*, 24:29.
5. Steele, W. J. and Busch, H.: (1963) *Cancer Res.*, 23:1153.
6. Callanan, M. J., Carroll, W. and Mitchell, E.: (1957) *J. biol. Chem.*, 229:279.
7. Feughelman, M., Langridge, R., Seeds, W. E., Stokes, A. R., Wilson, H. R., Hooper, C. W., Wilkins, M. H. F., Barclay, R. K. and Hamilton, L. D.: (1955) *Nature*, 175:834.
8. Alfert, M.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:109.
9. Vendrely, R., Knobloch-Mazen, A. and Vendrely, C.: (1960) *Biochem. Pharmacol.*, 4:19.
10. Johns, E. W., Phillips, D. M. P., Simson, P. and Buttler, J. A. V.: (1960) *Biochem. J.*, 77:631.
11. Lindsay, D. T.: (1964) *Science*, 144:420.
12. Bonner, J., Dahmus, M., Fambrough, D., Huang, R. C., Marushige, K. and Tuan, D.: (1968) *Science*, 159:47.
13. Felix, K., Fischer, H. and Krekels, A.: (1956) *Progr. Biophys.*, 6:1.
14. Alfert, M. and Geschwind, J. J.: (1953) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 39:991.
15. Huang, R. C. and Bonner, J.: (1962) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 48:1216.
16. Pollister, A. W. and Leuchtenberger, C.: (1949) *Nature*, 163:360.
17. Dounce, A. L., Tishkoff, G. H., Barnett, S. R. and Freer, R. M.: (1950) *J. gen. Physiol.*, 33: 629.
18. Alfrey, A. G., Stern, H., Mirsky, A. E. and Sac-tren, H.: (1951) *J. gen. Physiol.*, 34:529.
19. Busch, H.: (1965) *Histones and other nuclear proteins*. Academic Press, New York.
20. Wang, T. J.: (1967) *J. biol. Chem.*, 242:1220.
21. Frenster, J. H.: (1965) *Nature*, 206:680.
22. Kleinsmith, L. J., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55: 1182.
23. Langan, T. A.: (1967) In: *Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis*, p. 233. (Koningsberger and Bosch, eds.) Amsterdam, Elsevier.
24. Kleinsmith, L. J. and Allfrey, V. G.: (1969) *Biochim. biophys. Acta*, 175:123, 136.
25. Allfrey, V. G., Pogo, B., Littau, V., Gerhey, E. and Mirsky, A. E.: (1968) *Science*, 159:314.
26. Kornberg, A.: (1957) In: *The chemical basis of heredity*, p. 579. (Mac Elroy, W. D. and Glass, B., eds.) Johns Hopkins Press, Baltimore.

27. Weiss, S. B. and Nakamoto, T.: (1961) *J. biol. Chem.*, 236:PC18.
28. Stevens, A. J.: (1961) *J. biol. Chem.*, 236:PC43.
29. Weiss, S. B.: (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 46:1020.
30. Littlefield, J., McGovern, A. and Margeson, K.: (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 49:102.
31. McEwen, B. S., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: (1963) *J. biol. Chem.*, 238:2571, 2579.
32. Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: (1961) In: *Protein Biosynthesis*, p. 49. (Harris, R. J. C., ed.) Academic Press, New York.
33. Barton, J.: (1951) *Quantitative analysis of the results of the enzymatic digestion of nucleic*, Thesis. Univ. of Missouri, Columbia Co.
34. Tandler, J. C. and Solari, A. J.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:134a.
35. Stoneburg, C. A.: (1939) *J. biol. Chem.*, 129:189.
36. Dounce, A. J.: (1955) In: *The nucleic acids*, vol. 2, p. 93. (Chargaff, E. and Davidson, J. N., eds.) Academic Press, New York.
37. Ackerman, G. A.: (1952) *Science*, 115:629.
38. Boivin, A., Vendrely, R. and Vendrely, C.: (1948) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 226:1061.
39. Mirsky, A. E. and Ris, H.: (1948) *J. gen. Physiol.*, 31:1.
40. Vendrely, R.: (1954) *Internat. Rev. Cytol.*, 4:115.
41. Vendrely, R.: (1955) In: *The nucleic acids*. 2: 155. (Chargaff, E. and Davidson, J. M., eds.) Academic Press, New York.
42. Mirsky, A. E. and Ris, H.: (1951) *J. gen. Physiol.*, 34:451.
43. Swift, H.: (1950) *Anat. Rec.*, 105:56.
44. Pasteels, J. and Lison, L.: (1950) *Arch. Biol.*, 61:445.
45. Pollister, A. W., Swift, H. and Alfert, M.: (1951) *J. cell. comp. Physiol.*, 38: suppl. 1, p. 101.
46. Alfert, M.: (1950) *J. Cell. comp. Physiol.*, 36:381.
47. Caspersson, T.: (1950) *Cell growth and cell function*. W. W. Norton and Co., New York.
48. Solari, A. J.: (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 53:503.
49. Cairns, J.: (1966) *J. molec. Biol.*, 15:372.
50. Huberman, J. A. and Riggs, A. D.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55:599.
51. Du Praw, E. J. and Bahr, G. F.: (1968) *Abstr. Publ., 3rd Intern. Congr. Histochem. Cytochem.*, New York.
52. Rudkin, G. T.: (1967) In: *The chromosome*, p. 12, (G. Yerganian, ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
53. Howard, A. and Pelc, S. R.: (1953) *Heredity*, (6 suppl.): 261.
54. Prescott, D. M. and Bender, M. A.: (1963) *Exp. Cell Res.*, 39:430.
55. Kihlman, B. A. and Hartley, B.: (1967) *Hereditas*, 57:289.
56. Ito, M., Hotta, Y. and Stern, H.: (1967) *Develop. Biol.*, 16:54.
57. Stern, H. and Hotta, Y.: (1969) *Genetics*, 61:27.
58. Mazia, D.: (1961) In: *The cell*. (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.) 3:80. Academic Press, New York.
59. Taylor, J. H.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:455.
60. Bender, M. A. and Prescott, D. M.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 27:221.
61. Gilbert, C. W., Muldal, S., Lajtha, L. G. and Rowley, J.: (1962) *Nature*, 195:869.
62. German, J.: (1964) *J. Cell Biol.*, 20:37.
63. Hsu, T. C. and Somers, C. E.: (1963) *Proc. Internat. Congr. Zool. (Wash.)*, 4:269.
64. Kornberg, A.: (1962) *Ciba Lecture in Microbial Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York.
65. Lewinthal, C. and Crane, H. R.: (1956) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 42:436.
66. Goulian, M. and Kornberg, A.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1723.
67. Messelson, M. and Stahl, F. W.: (1958) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 44:671.
68. Cairns, J.: (1963) *J. molec. Biol.*, 6:208.
69. Taylor, J. H., Woods, P. S. and Hughes, W. L.: (1957) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 43:122.
70. Cairns, J.: (1966) *J. molec. Biol.*, 15:372.
71. Huberman, J. A. and Riggs, A. D.: (1968) *J. molec. Biol.*, 32:327.
72. Plaut, W., Nash, D. and Fanning, T.: (1966) *J. molec. Biol.*, 16:85.
73. Roth, T. F. and Ito, M.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:247.
74. Hotta, Y., Parchman, L. G. and Stern, H.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 60:575.
75. Prescott, D. M.: (1961) In: *Cell growth and cell division*. Intern. Soc. for Cell Biol., 2. Academic Press, New York.
76. Scherrer, K., Marcaud, L., Zajdela, F., London, I. and Gros, F.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:1571.
77. Attardi, G., Parnas, H., Hwang, M. and Attardi, B.: (1966) *J. molec. Biol.*, 20:145.
78. Warner, J., Soeiro, R., Birnbiom, C. and Darnell, J.: (1966) *J. molec. Biol.* 19:399.
79. Penman, S., Vesco, C. and Penman, M.: (1968) *J. molec. Biol.*, 34:49.
80. Soeiro, R., Vaughan, M. H., Warner, J. R. and Darnell, L. E., Jr.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:112.
81. Moulé, Y. and Chaveau, J.: (1968) *J. molec., Biol.*, 33:465.
82. Bernhard W. and Granboulan, W.: (1968) *The nucleus* Academic Press Inc., New York, p. 81.
83. Attardi, B. and Attardi, G.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1051.
84. Attardi, G. and Attardi, B.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 61:261.
85. Goldstein, L.: (1963) In: *Cell growth and cell division*. Int. Soc. for Cell Biology, 2:129. Academic Press, New York.
86. Goldstein, L. and Prescott, D. M.: (1967) *J. Cell Biol.*, 33:637.
87. Beck, J. S.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 28:406.
88. Hancock, R. J.: (1969) *J. molec. Biol.*, 40:457.
89. Mitchison, J. M.: (1968) *Excerpta med. Intern. Congr., Series*, 166:26.

Ribosomas. Estructura y biogénesis

El concepto de *ribosoma* como partícula submicroscópica definida, compuesta por ácido ribonucleico y proteínas, fue esbozado en los capítulos 1 y 2. Desde el punto de vista fisiológico, los ribosomas son “maquinarias” celulares para la síntesis proteica, proceso por el cual los aminoácidos se unen en un orden determinado con el objeto de constituir la cadena polipeptídica. Además de la unión de los aminoácidos activados, la síntesis proteica requiere la interacción ordenada de tres tipos de ácido ribonucleico (ARN) de origen nuclear: el ribosómico, el de transferencia y el mensajero.

Los ribosomas fueron reconocidos con el microscopio electrónico como *partículas densas* o *gránulos*,¹ que luego se aislaron demostrándose su contenido en ARN.² El progreso en materia de microscopía electrónica y de las técnicas de ultracentrifugación hicieron posible determinar con exactitud el tamaño de los ribosomas, mientras que el uso de radioisótopos llevó a estudiar las propiedades sintéticas de esas partículas. La recopilación de todos estos hechos ha permitido en los últimos años generalizar el concepto de que los ribosomas son componentes universales de los organismos biológicos.

En relación con la evolución citológica, constituyen una parte esencial del protoplasma de muchas bacterias, en las cuales el sistema vacuolar todavía no se ha desarrollado, y de micobacterias, donde aparecen sólo unos pocos sistemas de membranas citoplásmicas. La mayor parte de los ribosomas se encuentran libres en la matriz de células de levadura, reticulocitos, tejidos meristemáticos vegetales (fig. 12-4) y células nerviosas embrionarias (fig. 9-1). En las células vegetales puede observarse que preceden al desarrollo de las membranas.²⁰

En células vinculadas con la síntesis proteica, como las plasmáticas y las que secretan enzimas, los ribosomas suelen hallarse adheridos a las membranas de ciertas partes del sistema vacuolar. Dicha relación sugiere que las membranas lipoproteicas colaboran en la separación de la proteína recientemente sintetizada por los ribosomas, así como en su transporte y excreción.³ La disposición bidimensional de los ribosomas sobre la membrana podría incluso facilitar la síntesis. En la figura 18-1 se aprecia cómo los ribosomas están dispuestos sobre las membranas formando pequeñas cadenas que corresponden a polirribosomas (véase más adelante).⁴

En células de embrión de pollo sometidas a hipotermia, se organizan en láminas con disposición cristalina, y tienen como unidad una celda cuadrada. Estos cristales se interpretan como grupos de ribosomas inactivos que no están asociados con ARN mensajero y que carecen de la proteína naciente.⁵

Número y concentración

El número y concentración de los ribosomas se encuentran directamente relacionados con el contenido de ARN de la célula y, por ende, con las propiedades basófilas del citoplasma. En todas las células que contienen *ergastoplasma* (*sustancia basófila*) existen masas de ribosomas (figs. 9-1 y 18-1). Por ejemplo, en la base de las células glandulares, en plasmocitos, hepatocitos y en los cuerpos de Nissl de células nerviosas, lo mismo que en cualquier célula animal o vegetal de crecimiento rápido, las propiedades tintóreas y el contenido de ARN pueden correlacionarse con la concentración ribosómica. Este hecho también se comprueba en bacterias. En reticulocitos de conejo hay cerca

de 100 ribosomas por micrón cúbico, lo que equivale a 1×10^5 partículas por célula, y alrededor de 0.5 por ciento del volumen celular total.

En un mililitro de hígado se hallan aproximadamente 2×10^{13} ribosomas.

En *Escherichia coli*, en la etapa de crecimiento máximo, los ribosomas llegan a constituir del 25 al 30 por ciento de la masa celular, contándose entre 20,000 y 30,000 por célula. Sin embargo, cuando se inhibe la velocidad de la síntesis proteica (en condicio-

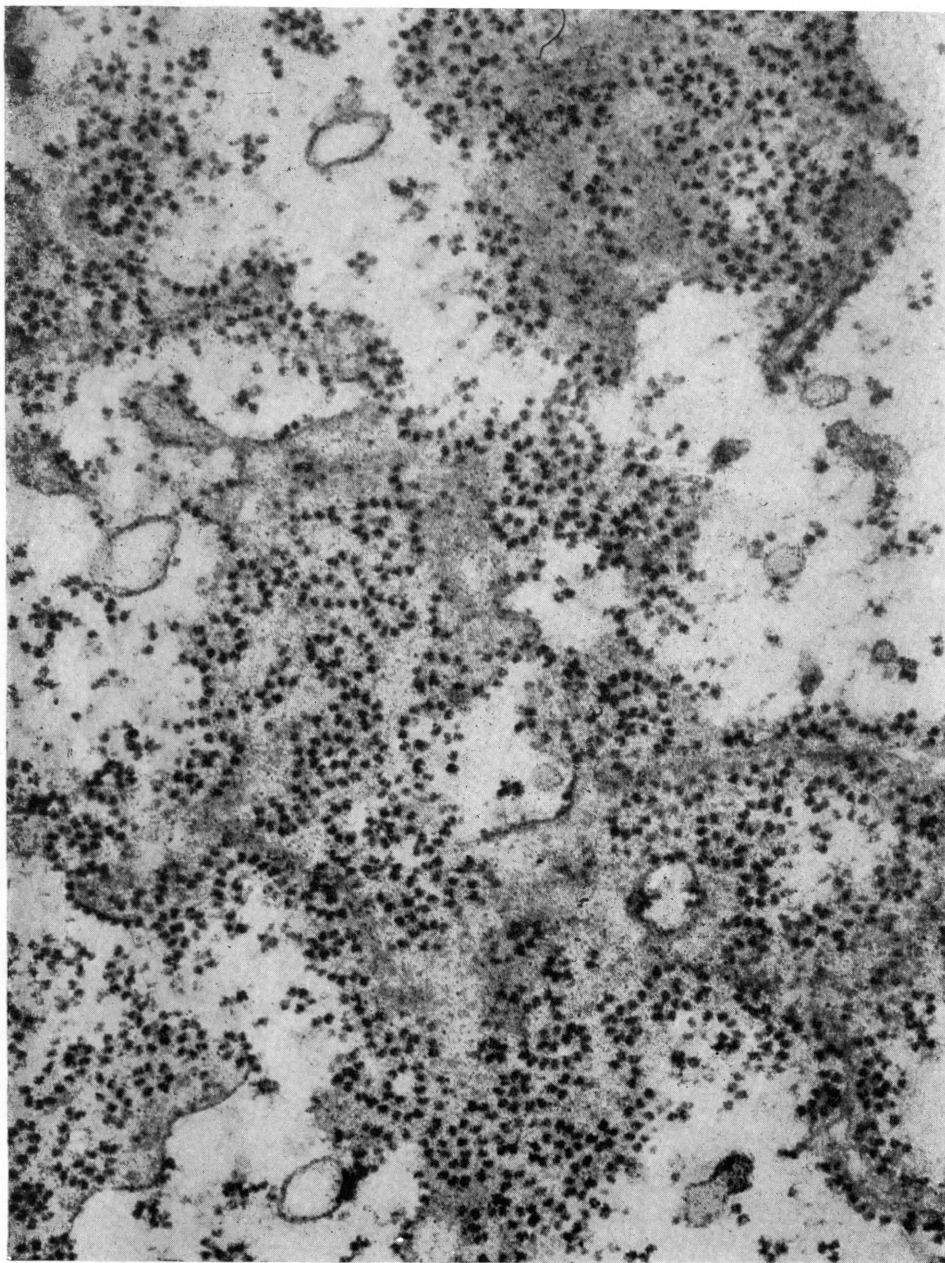


FIG. 18-1. Fotomicrografía electrónica de una célula epidérmica del pelo de la raíz del rábano. El corte tangencial a la membrana del RE pone de manifiesto grupos de ribosomas (polirribosomas) dispuestos en figuras recurrentes. 57,000 $\times$. (Cortesía de H. T. Bennett y E. H. Newcomb.)

nes nutritivas deficientes, por ejemplo), el contenido de ribosomas puede disminuir notablemente.⁶

Las dos clases principales de ribosomas

Los ribosomas presentan una notable uniformidad de tamaño, estructura y composición en los diferentes tipos celulares de los cuales se han aislado. El aislamiento es relativamente simple en las bacterias y reticulocitos, donde los ribosomas están libres. En las células superiores, las membranas intracelulares deben ser solubilizadas antes con agentes tensioactivos (por ejemplo desoxicolato) para liberar a los ribosomas (fig. 10-15).

La medida del coeficiente de sedimentación por medio de la ultracentrifugación demuestra que existen dos tamaños principales en los ribosomas. En los ribosomas bacterianos el coeficiente de sedimentación equivale a 70 S y corresponde a un peso molecular de 2.7×10^6 Daltons, mientras que en los de células eucariontes, sean vegetales o animales, dicho coeficiente es de alrededor de 80 S, con un peso molecular de 4×10^6 Daltons (tabla 18-1).

TABLA 18-1. Las dos clases principales de ribosomas

(De Kintzel y Noll, 1967.)

Hígado	81	80 S	60	P.M. = 4×10^6
Levadura	80		28	
Haba	78	70 S	40	ARN 45 %
Neurospora ...	77		18	
Mitocondria ...	73	70 S	50	P.M. = 2.7×10^6
<i>Escherichia coli</i>	70		23	
Cloroplastos ...	67	70 S	30	ARN 65 %
<i>Rhodospirillum</i>	66		16	

En capítulos anteriores se mencionó que los ribosomas fueron hallados en ciertos orgánoides celulares como cloroplastos y mitocondrias; en ambos casos son pequeños, similares a los bacterianos. Algunos autores describieron la presencia de ribosomas en el núcleo, pero ello ha sido negado por otros. No obstante, las subunidades ribosómicas se originan en el núcleo y luego se combinan en el citoplasma de la célula.

Subunidades ribosómicas

El ribosoma es por lo general un esferoide oblongo de aproximadamente 250×150 A. Empleando coloración negativa, se ve una hendidura que lo divide en una subunidad pequeña y en otra más grande. En *E. coli*, la partícula mayor tiene forma de cúpula (140-160 A), en tanto que la más pequeña configura una especie de "sombrero" y se aplica a la superficie plana de aquélla.⁷ En células superiores, el ribosoma está adherido a la membrana microsómica por medio de la subunidad mayor, observándose asimismo la separación entre las dos subunidades en forma paralela a la membrana^{8,9} (fig. 18-2).

Los ribosomas requieren bajas concentraciones de Mg^{++} (0.001 M) para mantener su cohesión estructural. Cuando la concentración de Mg^{++} aumenta diez veces, dos ribosomas se combinan para constituir un "dímero", con el doble de peso molecular. Si la concentración disminuye, el ribosoma único se disocia en subunidades (fig. 18-3). En un ribosoma de 80 S las dos subunidades producidas son de 60 y 40 S, las que en presencia de Mg^{++} pueden reformar la unidad primitiva (fig. 18-3). La unión con el Mg^{++} parece realizarse mediante el fosfato del ARN y no por medio de la proteína. En la tabla 18-1 se observa que los ribosomas 70 S tienen subunidades de 50 y 30 S. Se ha conseguido formar con subunidades de distintas especies ribosomas híbridos de 70 S, en los cuales pudo medirse su actividad en la síntesis de proteína.¹⁰

La ultraestructura de los ribosomas es muy compleja y aún no se halla dilucidada por completo. Como el ribosoma es sumamente poroso e hidratado, el ARN y la proteína están presumiblemente interconectados dentro de las dos subunidades. En cortes coloreados con iones uranilo, que tiñen selectivamente el ARN, cada ribosoma se presenta como un cuerpo estrellado con cuatro a seis brazos implantados en un eje denso. La subunidad 50 S aislada del *Bacillus subtilis* aparece como una partícula compacta de 160 a 180 A y tiene una cara pentagonal en cuyo centro se observa una área circular de 40 a 60 A.¹¹ En la subunidad mayor se ha descrito una zona central transparente a los electrones, que en preparaciones teñidas negativamente corresponde a una región opaca.¹² La subunidad 40 S no es regular y tiende a estar subdividida en dos porciones, interconectadas por un fi-

lamiento de 30 a 60 Å de ancho (fig. 18-2, *a*). De los datos aportados por diversas experiencias va surgiendo un modelo de ribosoma en el cual la subunidad de 50 S posee una especie de agujero, al que no podrían franquear ni las enzimas proteolíticas ni las ribonucleasas (fig. 19-11). De este modo, el ARN mensajero adherido a la subunidad 30 S y la cadena polipeptídica naciente conectada con la 50 S estarían protegidos para no degradarse (véase cap. 19).

ARN-s ribosómicos 28, 18 y 5 S

Los principales constituyentes de los ribosomas son el ARN y las proteínas, en proporciones aproximadamente iguales, con poco o ningún material lipídico. En *E. coli*, el contenido en proteínas ribosómicas es menor que en las células superiores (tabla 18-1). Se cal-

cula que existen alrededor de 6000 nucleótidos por ribosoma. Las cargas positivas de las proteínas no son suficientes para compensar las numerosas cargas negativas en la cadena esterfosfórica del ARN; por ello los ribosomas son intensamente negativos y fijan cationes y colorantes básicos.

El ARN ribosómico se encuentra en las dos subunidades, formando una partícula de 28 S y otra de 18 S, con pesos moleculares de 1.3×10^6 y 6×10^5 Daltons, respectivamente, para las partículas de 60 y 40 S. En las bacterias, los ARN son de 23 y 16 S (tabla 18-1). Se cree que cada subunidad ribosómica contiene un filamento muy plegado de ácido ribonucleico sobre el cual se adhieren las distintas proteínas. Después de obtener el despliegue del filamento, se estimó que su longitud era de 7000 Å,¹³ y su contenido en proteína de aproximadamente el 40 por ciento.

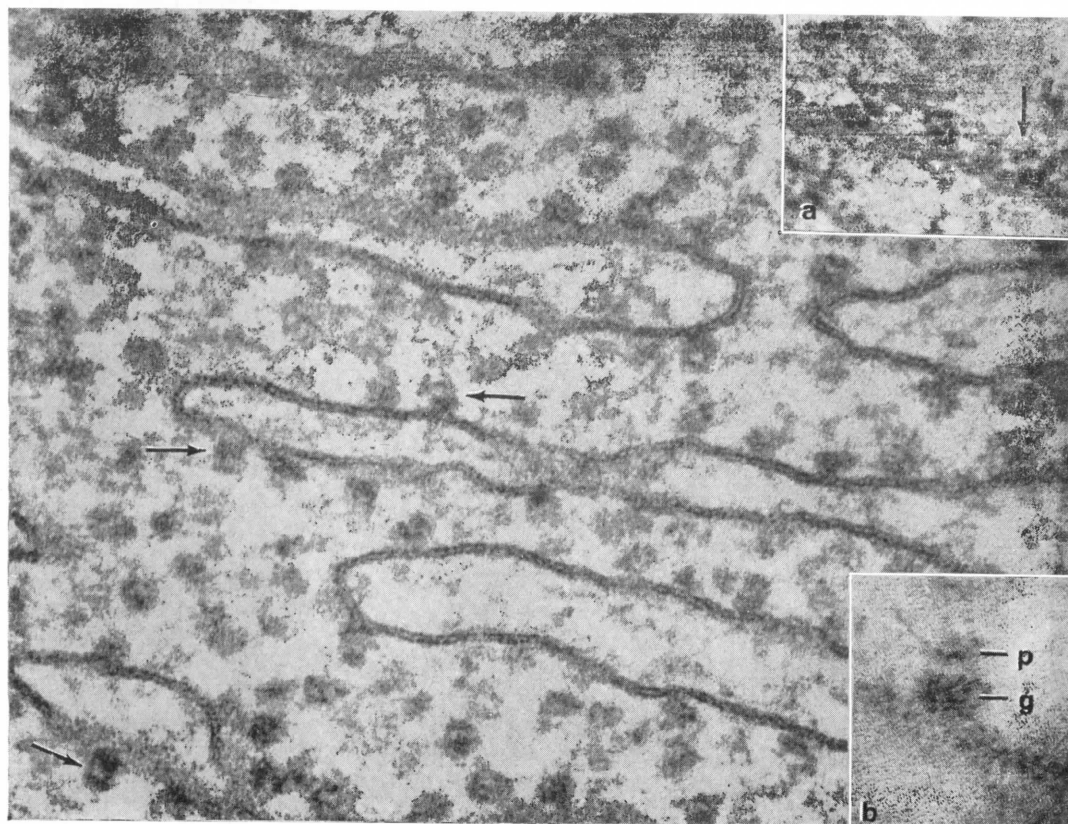


FIG. 18-2. Fotomicrografía electrónica de ribosomas adheridos a las membranas del RE. Con flechas se indican algunos ribosomas en los que la unión por la subunidad 60 S es más evidente. 208,000 $\times$. (Cortesía de G. E. Palade.) En *a* se ve, además, que la pequeña subunidad consta de dos partes (flecha). En *b* se observa la hendidura que separa la partícula pequeña (*p*) de la grande (*g*). (*a*, 200,000 $\times$; *b*, 410,000 $\times$.) (Cortesía de N. T. Florendo.)

En ciertas condiciones, los filamentos pueden volver a plegarse. La organización interna del ribosoma no ha sido totalmente aclarada. Puesto que los ribosomas se unen con facilidad a los colorantes básicos, es presumible que el ARN esté en su superficie y que la proteína se halle en el interior, en relación con partes no helicoidales de aquél. Alrededor del 60 por ciento del ARN es helicoidal (doble cadena) y contiene bases apareadas. Esta es la parte que se supone situada en la superficie de las subunidades.¹⁴ Las porciones helicoidales son las más resistentes al tratamiento con ribonucleasa.

La composición de bases del ARN ribosómico de diferentes orígenes es variable (tabla 18-2) y no sigue la regla de bases carac-

terística del modelo de Watson-Crick para el ácido desoxirribonucleico (ADN) (véase cap. 4). Las bases más abundantes son la guanina y la adenina. Tanto el ARN ribosómico 28 S como el de 18 S contienen un número característico de grupos metilo en su mayor parte como 2'-0-metil-ribosa.

En *E. coli* y en células superiores se ha identificado un nuevo componente del ARN ribosómico cuyo coeficiente es de 5 S y su longitud de 120 nucleótidos.¹⁷ Este pequeño ARN se halla dentro de la subunidad mayor en una relación 1:1 con el ARN 28 S (en las células de mamíferos),^{15,16} y fue posible determinar en él la extensión del apareamiento de bases.¹⁸ El ARN 5 S posee una forma de hoja de trébol similar a la del ARN de tras-

TABLA 18-2. Composición en nucleótidos del ARN ribosómico de diferentes orígenes (De Bonner.²²)

Material	Proteína sintetizada	Moles/100 moles			
		A	U	G	C
Ribosomas de guisante	Enzimas de tallo de guisante.	24.0	21.5	32.9	21.5
Ribosomas de reticulocitos de conejo	Hemoglobina de conejo.	18.5	18.5	34.4	28.6
Ribosomas de reticulocitos de oveja	Hemoglobina de oveja.	18.0	17.2	34.4	30.3

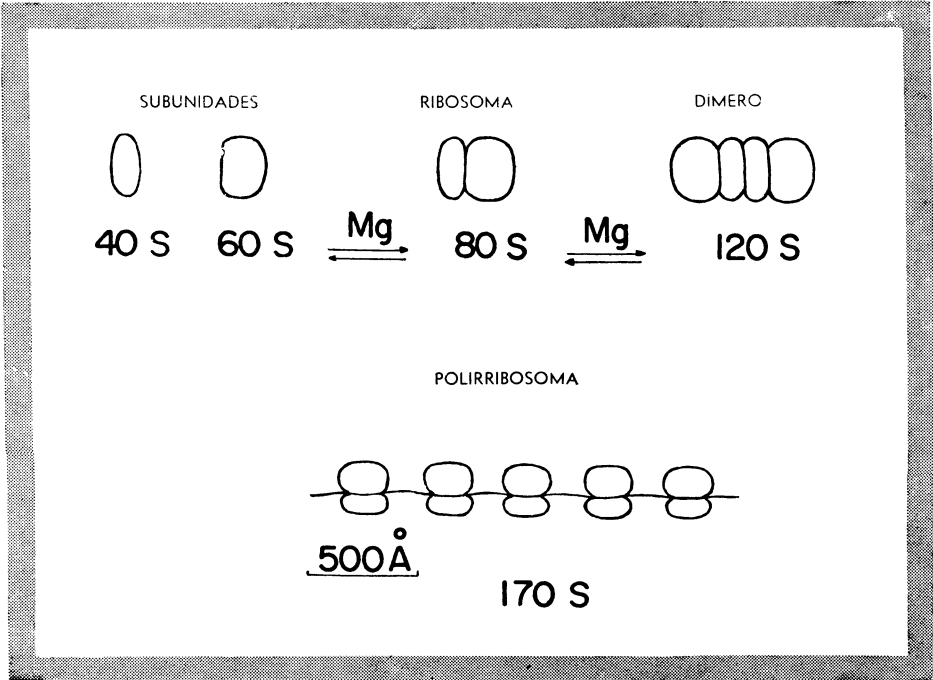


FIG. 18-3. Esquema de la estructura del ribosoma, la influencia del Mg, y un polirribosoma formado por cinco ribosomas. Se considera como ARN mensajero al filamento que une los ribosomas. Se indican las constantes de sedimentación (S) de las diversas partículas.

ferencia 4 S (véase cap. 19) pero su función es todavía desconocida.

Proteínas ribosómicas

Los estudios de fraccionamiento ribosómico pusieron de manifiesto que su contenido en proteínas es sumamente complejo. Se han identificado alrededor de 50 proteínas diferentes usando diversos procedimientos.

Como se advierte en el esquema de la figura 18-4 tanto la subunidad 50 S como la 30 S han sido disociadas en dos partículas centrales inactivas (40 y 23 S, respectivamente), que contienen ARN y algunas proteínas, mientras que otras de éstas, las *proteínas separables* (SP), son liberadas de cada partícula. Las SP 50 y 30 reconstituyen la subunidad funcional cuando se agregan a las partículas centrales correspondientes. Algunas de las proteínas separables son aparentemente específicas para cada subunidad ribosómica. Dichas proteínas han sido subfraccionadas y divididas en ácidas (A) y básicas (B), existiendo por lo menos seis grupos diferentes de ellas en el ribosoma¹⁹ (fig. 18-4).

Si se colocan las partes centrales de 40 y 23 S en presencia de las proteínas ácidas y básicas correspondientes, pueden obtenerse partículas reconstituidas de distintos tipos y analizar su función. Por ejemplo, se sabe que los SP 50 A son indispensables para

la síntesis polipeptídica; la peptidiltransferasa o péptido-sintetasa, enzima que cataliza la formación de uniones peptídicas, es una parte integrante de la subunidad 50 S.²⁰ Las proteínas de la subunidad 50 S se necesitan para la unión del ARN-t, así como para la incorporación del aminoácido.

De la partícula 30 S fueron aisladas alrededor de 20 proteínas con propiedades electroforéticas y composición aminoácida específica, y se cree que están codificadas por diferentes cistrones de ADN.²¹ En general, se encuentran presentes en una copia única dentro de la partícula 30 S.²² Las proteínas de la subunidad 50 S son más complejas, habiéndose separado e identificado cerca de 30.

Reconstitución de los ribosomas

Se ha logrado reconstituir subunidades de 30 S funcionales con el agregado del ARN-r 16 S y de una mezcla de proteínas provenientes de aquéllas.^{19, 23}

Cabe destacar que tanto la reconstitución de las unidades ribosómicas como la del ribosoma completo tiene lugar espontáneamente. Son reformados, lo mismo que las subunidades de algunas proteínas (véase cap. 4, "Estructura cuaternaria"), por el principio de "autoarmado". La organización compleja de este organoide es susceptible de disociarse y regenerarse por simples interacciones fisicoquímicas de sus macromoléculas componentes, ello puede efectuarse *in vitro* y en ausencia de estructuras celulares pre-existentes.²⁴

La disociación de la subunidad 30 S se obtiene tratándola con urea 4 M y Cl Li 2 M, que separan las proteínas. Si la 16 S es extraída previamente con fenol y colocada en presencia de las 20 proteínas que proceden de la subunidad 30 S, la reconstitución ocurre en dos pasos. En el primero, realizado a 0°C

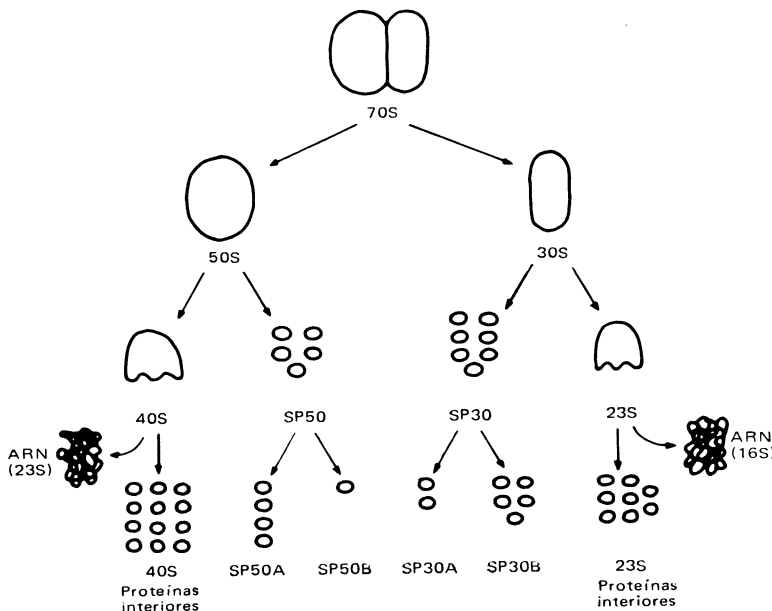


FIG. 18-4. Esquema que representa los componentes ribosómicos. (Véase la descripción en el texto.) (De M. Nomura y P. Traub.)

durante una hora, se constituyen partículas R_1 de 22 S que son inactivas en la síntesis proteica. El segundo paso debe realizarse a 40°C y por espacio de 20 minutos para obtener las partículas 30 S completamente activas. Se cree que el ARN 16 S posee sitios de unión para cada una de las 20 proteínas y que el proceso de armado se produce de modo paulatino (Traub y Nomura, 1969).

La reconstitución de la 30 S es sumamente específica. Puede conseguirse mediante el ARN 16 S de otras bacterias pero no con el ARN 16 S de levadura o el ARN 23 de *E. coli*. Tampoco se verifica con el ARN 18 S en el hígado, en presencia de las proteínas 30 S de *E. coli*. Estos experimentos de reconstitución permiten formarse una idea más acabada del papel de cada especie proteica en la función del ribosoma.

Por ejemplo, de la subunidad 30 S se aislaron cinco proteínas básicas (B)²⁵ cuya función individual ha sido investigada en experimentos de reconstitución. De ellas, dos (B_3 y B_5) son factores esenciales en la síntesis proteica, por la función que desempeñan en la incorporación del aminoacil-ARN-t a la subunidad 30 S (véase cap. 19). Una tercera proteína básica, la B_4 , podría estar relacionada con la formación del complejo de iniciación en la síntesis proteica.

Otro interesante hallazgo lo constituye el hecho de que varias proteínas ribosómicas están controladas por genes diferentes: en una cepa de *E. coli* resistente a la estreptomycinina existe una proteína especial en la subunidad 30 S que, cuando falta, impide la unión con la estreptomycinina- H_2 (Mozaki y col., 1969).

Biogénesis de los ribosomas en células eucariontes

La formación de ribosomas en células superiores es diferente de la que se aprecia en procariontes. Mientras que en las bacterias los ARN ribosómicos están codificados en cromosomas específicos del genoma (el ADN ribosómico) y son liberados inmediatamente, en el eucarionte se forman en el nucléolo.

Se sabe actualmente que del organizador nucleolar, que contiene ADN ribosómico (ADN-r) es transcrita una gran molécula de ARN (45 S), precursora tanto de los ARN ribosómicos 28 S como del 18 S. La organización de las subunidades ribosómicas incluye varias etapas hasta que son completadas y pasan al citoplasma.²⁶⁻³⁰

En el capítulo 16 se mencionó la correlación existente entre el tamaño y la coloración basófila de los nucléolos y la actividad metabólica celular. Dicha correlación fue confirmada por Caspersson, mediante el empleo de absorción ultravioleta y una técnica específica para el ARN (test de Brachet; véase cap. 7).

El descubrimiento de los ribosomas y de su actividad en la síntesis proteica sugirió una

relación entre esos organoides y el nucléolo. Los organizadores nucleolares, de los cuales proceden los nucléolos después de la división celular, fueron interpretados como los sitios cromosómicos que contienen los genes codificadores del ARN ribosómico. Finalmente, la aplicación de métodos de la Biología molecular puso de manifiesto el papel fundamental del nucléolo en la biogénesis ribosómica.

Organizador nucleolar y ADN ribosómico

En 1964 se demostró que una mutante *anucleada* del anfibio *Xenopus laevis* era incapaz de sintetizar ARN-r.³¹ Las células diploides de la variedad salvaje de *X. laevis* tienen dos nucléolos, la heterocigota posee sólo uno por célula diploide y la mutante homocigota es anucleada. Esta última condición resulta letal y el embrión muere en el período en que comienza el esbozo de la cola. Hasta entonces utilizaba probablemente los ribosomas maternos para realizar su síntesis proteica.

Con la técnica de hibridización ADN-ARN³² (véase cap. 4) fue posible comprobar que el ADN asociado al nucléolo es el único que codifica el ARN-r. En estos experimentos, el ADN es sometido a desnaturalización, y cuan-

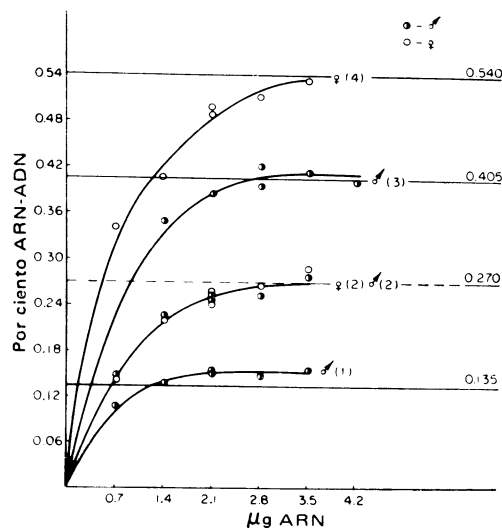


FIG. 18-5. Experimento que demuestra que el ADN complementario con el ARN ribosómico está asociado al organizador del nucléolo. Obsérvese que el nivel de saturación del híbrido ADN-ARN-r aumenta con el número de organizadores nucleolares presentes. Se usaron cepas de *Drosophila* que contenían uno, dos, tres y cuatro organizadores. (De F. M. Ritossa y S. Spiegelman.)

do se separan las dos cadenas, se hibridizan con ARN marcado con isótopos radiactivos. La cantidad máxima de ARN-r que se liga a una porción definida del ADN (nivel de saturación), es una medida del número de moléculas dobles ADN-ARN formadas. Esto permite estimar el número de cistrones o de complementos de ADN que codifican el ARN-r. Usando esa técnica en la variedad salvaje, así como en las mutantes heterocigotas y homocigotas de *Xenopus*, se descubrió que cada organizador nucleolar contenía alrededor de 1000 cistrones de ADN-r. En la variante heterocigota la saturación se obtuvo a la mitad del nivel hallado en la variedad salvaje, y en la mutante homocigota no se encontraron cistrones para el ARN-r.³³

Un experimento similar se realizó en *Drosophila melanogaster*, donde el organizador nucleolar está contenido en una región heterocromatínica del cromosoma X o Y.³⁴ Con la técnica de hibridización ADN-ARN se analizaron colonias en las que el organizador era deficiente o se hallaba duplicado. El nivel de saturación para la variedad salvaje es el mismo (alrededor del 0.27 por ciento) para los machos que para las hembras (fig. 18-5). En la mutante que tenía sólo un organizador, el nivel de saturación estaba reducido a la mitad, y éste era proporcionalmente mayor en las mutantes de *Drosophila* con 3 ó 4 organizadores. Se calcula que existen alrededor de 130 cistrones de ADN-r por organizador en el nú-

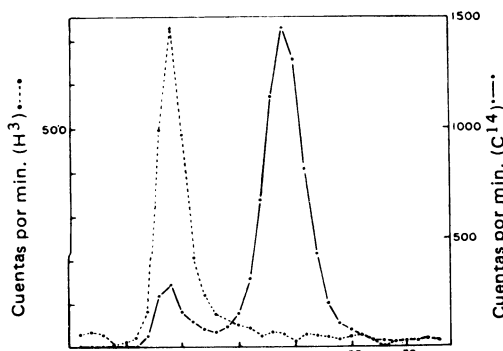


FIG. 18-6. Experimento en ovario de *Xenopus* que demuestra la presencia del ADN ribosómico. La línea llena indica el diagrama de ultracentrifugación en cloruro de cesio correspondiente a ADN marcado con C¹⁴. Se observa un pico principal y otro más pequeño, denominado satélite. Con línea punteada se indica el resultado de experimentos en los que se hizo la hibridización con ARN ribosómico marcado con tritio. Se advierte que ésta coincide con el ADN satélite. (Cortesía de J. G. Gall.)

cleo haploide de la variedad salvaje de *Drosophila*. En las mutantes de *Drosophila*, denominadas "bobbed", en las cuales los genes están contenidos dentro de la misma región heterocromatínica del cromosoma X donde se encuentra presente el organizador nucleolar, el número de cistrones ADN-r puede ser reducido, calculándose que por debajo de 40 copias de cistrones de ADN-r aparece la letalidad.³⁵

Aislamiento de los cistrones de ADN-r

El aislamiento de cistrones de ADN-r se consiguió por primera vez en el sistema *X. laevis* usando técnicas de hibridización y de ultracentrifugación con gradientes de densidad de cloruro de cesio.³⁶ En todas las preparaciones fue hallada una *banda satélite* de ADN con una densidad de flotación de 1,723 (ésta es de 1,698 en la banda principal), excepto en la mutante homocigota. El ADN satélite, que comprende sólo 0,15 a 0,20 por ciento del ADN total, es muchas veces más activo en la formación de híbridos con el

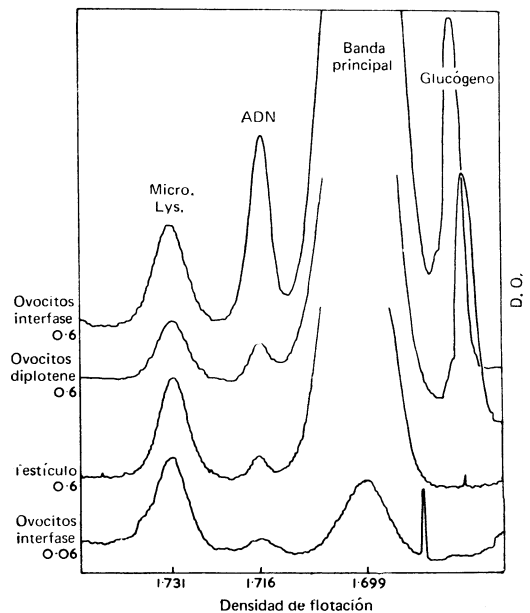


FIG. 18-7. Ácido desoxirribonucleico de varios tejidos del insecto Acheta, estudiados por ultracentrifugación. Se observa que el ADN ribosómico (ADN-r) tiene una densidad de flotación de 1,716. Este pico es más pronunciado en los ovocitos en la interfase. La densidad del ADN-r se compara con la de la banda principal ($d = 1,699$), con la del ADN de una bacteria y con la del glucógeno. (Cortesía de A. Lima de Faria.)

ARN-r que el componente principal y se caracteriza también por un contenido más alto en CG (70 por ciento) que el ADN somático. En la figura 18-6 se observa el pico principal de ADN y su pequeño pico satélite. Al mismo tiempo, puede verse que la hibridización del ADN-ARN-r coincide esencialmente con el pico satélite menor.³⁷

Otro ejemplo interesante de redundancia-ADN se evidencia en ovocitos del insecto *Acheta domesticus*, que presentan un gran cuerpo conteniendo ADN e histonas.³⁸ Este cuerpo de ADN aparece en la ovogonia y aumenta considerablemente de tamaño durante la interfase y en los primeros estadios de la meiosis. En el paquiteno se produce una cubierta externa de ARN y en el diploteno el cuerpo de ADN se desintegra. Mediante centrifugación analítica (figura 18-7) se comprueba que en la interfase el ADN-r satélite, con una densidad de flotación de 1.716, es más prominente. Este tipo de ADN, que se hibridiza con ARN ribosómico, tiende a desaparecer en el diploteno y está prácticamente ausente de los testículos.³⁹

El hecho de que el ADN satélite pueda aislarse, constituye una evidencia de que los cistrones de ADN-r se encuentran dentro del genomio en grupos extendidos y en una serie lineal repetitiva. Podríamos preguntarnos si los cistrones de ADN-r 28 y 18 S están en una secuencia alternante o si tienen alguna otra disposición a lo largo del ADN satélite. Distintos tipos de experimentos realizados en *X. laevis* y en *Drosophila* demuestran que aquéllas se hallan en cantidades similares y son estrictamente alternantes.⁴⁰⁻⁴³

Los genes que codifican el pequeño ARN 5 S (asociado dentro de la subunidad ribosómica larga) no están aparentemente ligados al organizador nucleolar y se presentan en la mutante anucleolada del *Xenopus*.⁴⁰

Amplificación por redundancia de los cistrones de ADN-r

En los ejemplos antes mencionados de *Drosophila* y de *X. laevis* tiene lugar en el ADN un grado considerable de *amplificación* o *redundancia* de los cistrones para el ARN-r. Ello es particularmente evidente en muchos ovocitos de anfibios, en los que el núcleo suele alcanzar un diámetro de más de 0.5 mm y contiene alrededor de 1000 nucléolos o más. Tal amplificación genética contribuye a que la célula realice su intensa síntesis de ARN-r, la cual puede ser 100.000 veces mayor por genomio que en la célula hepática. En la tabla 18-3 se indica el porcentaje del ADN

total comprendido en la síntesis de ARN-r y el grado de amplificación por genomio haploide en varios organismos. Obsérvese que en las bacterias existe sólo un pequeño grado de amplificación del ADN ribosómico comparado con los otros ejemplos mencionados.

La redundancia del ARN-r constituye un medio por el cual las células controlan la producción de ribosomas, pero aparentemente no es el único. Experimentos de hibridización efectuados en tejidos somáticos de pollo (riñón, hígado, embrión), con diferentes velocidades de síntesis de ARN-r, demostraron la presencia de un número similar de cistrones de ARN-r (alrededor de 100 por genomio haploide). Aun en espermatozoides y eritrocitos, en los que se ha suspendido la producción de ribosomas, se alcanza el mismo nivel de saturación de ADN-ARN-r.⁴⁴ Es obvio que en el último caso los cistrones de ADN-r no son funcionantes.

TABLA 18-3. Amplificación de los cistrones ADN-r en varios organismos

Organismos	Porcentaje de ADN-r	Cistrones de ADN-r por genomio haploide
E. coli	0.42-0.65	8-22
B. subtilis	0.38	9-10
Células Hela	0.005-0.02	160-140
Drosophila (variedad salvaje)	0.27	130
Xenopus (variedad salvaje)	0.06-0.11	1200-3000

Estadios en el procesamiento del ARN-r en el nucléolo

El aislamiento de preparaciones nucleolares relativamente libres de cromatina en células de *cultivos de tejidos*,⁴⁵ ha hecho posi-

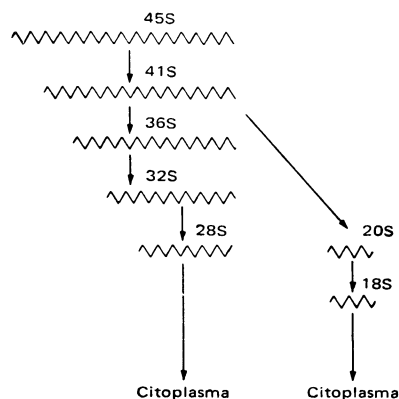


FIG. 18-8. Esquema que representa las etapas de la transformación del ARN nucleolar de 45 S, en los ARN ribosómicos de 28 S y 18 S. (De M. Williams y S. Penman.)

ble obtener una información más definida acerca de los pasos que incluye la síntesis y procesamiento de los precursores del ARN-r. Después de la formación de la molécula precursora inicial el ARN-r 45 S que tiene lugar en el nucléolo, se producen una serie de procesos hasta que los ARN 28 y 18 S llegan al citoplasma⁴⁶ (fig. 18-8). El tiempo estimado para la transcripción de los precursores del 45 S es de 2,3 minutos. Esta molécula es entonces metilada y permanece en el nucléolo alrededor de 20 minutos siendo dividida en subunidades 32 y 18 S por medio de varios pasos intermedios que implican pérdida de porciones no metiladas de la molécula. El ARN 18 S

pasa rápidamente al citoplasma y se incorpora a la unidad pequeña del ribosoma. El 32 S permanece intacto en el nucléolo durante 40 minutos y es nuevamente separado para formar el ARN 28 S que se mantiene en el nucléolo otros 30 minutos antes de entrar en el citoplasma. La figura 18-9 ilustra los picos principales (45, 32 y 28 S) de ARN ribosómico encontrados en el nucléolo y algunos de los picos menores y más transitorios (41 y 36 S). Se advierte que el componente 18 S está prácticamente ausente.

TABLA 18-4. Pesos moleculares aproximados de los diferentes ARN-r y posibles longitudes de las moléculas extendidas.^{47, 48}

ARN-r	PM en Daltons	Longitud en micrones
45 S	4.5×10^6	~ 4.5
32 S	2.2×10^6	~ 2.2
28 S	1.6×10^6	~ 1.6
18 S	0.6×10^6	~ 0.6

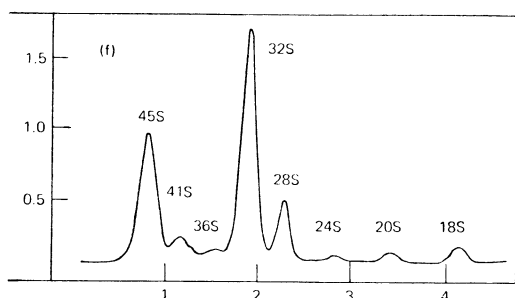


FIG. 18-9. Principales picos de ARN ribosómico, observados en los nucléolos de células HeLa. (Véase la descripción en el texto.) (De R. A. Weinberg y S. Penman.)

De los datos enumerados en la tabla 18-4 es evidente que cerca de la mitad de la molécula 45 S se pierde durante la formación de los ARN-s 18 S y 28 S. Las porciones descartadas son ricas en CG y poseen pocas bases metiladas; es decir que del 45 S al 28 S y 18

SÍNTESIS Y MADURACIÓN DE RIBOSOMAS EN EL NUCLEOLO

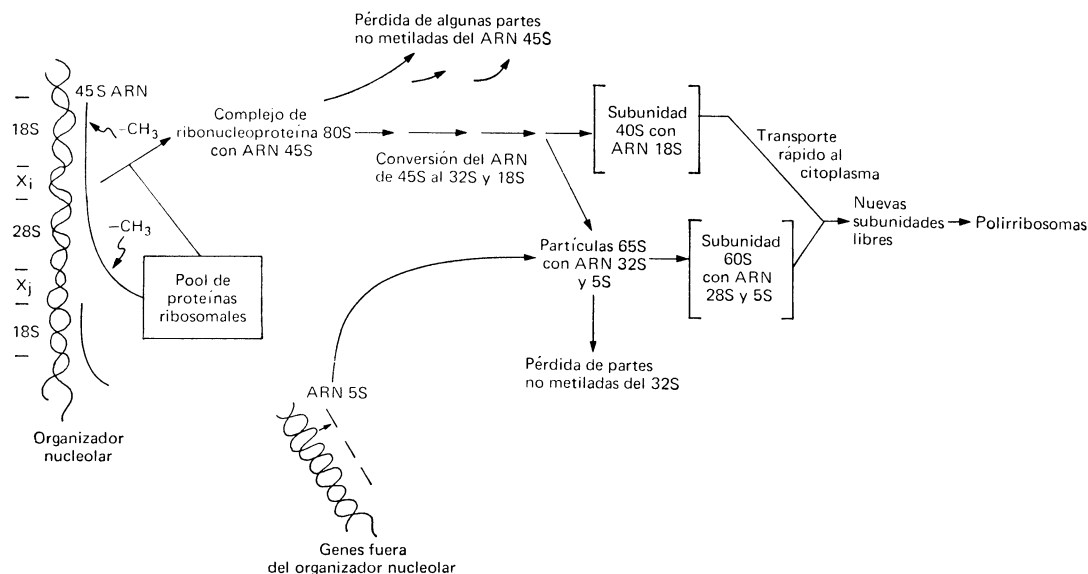


FIG. 18-10. Estadios de las biogénesis en los ribosomas. (Cortesía de R. P. Perry.)

S disminuye el contenido en CG y aumentan los grupos metilo en la 2'-O-metilribosa.

El papel del nucléolo en la síntesis del ARN-r ha sido confirmado al demostrarse que la actinomicina D en pequeñas dosis suprime selectivamente la incorporación de nucleótidos en el nucléolo y los ribosomas, mientras que el ARN cromosómico no es afectado.^{49,50}

También el 45 S y otros precursores de ARN-r son inhibidos por la actinomicina.⁴⁷

Síntesis de proteínas ribosómicas y armado de los ribosomas

La complejidad de la estructura del ribosoma en lo que respecta a su contenido en proteínas, de las que se han reconocido alrededor de 50 tipos (véase

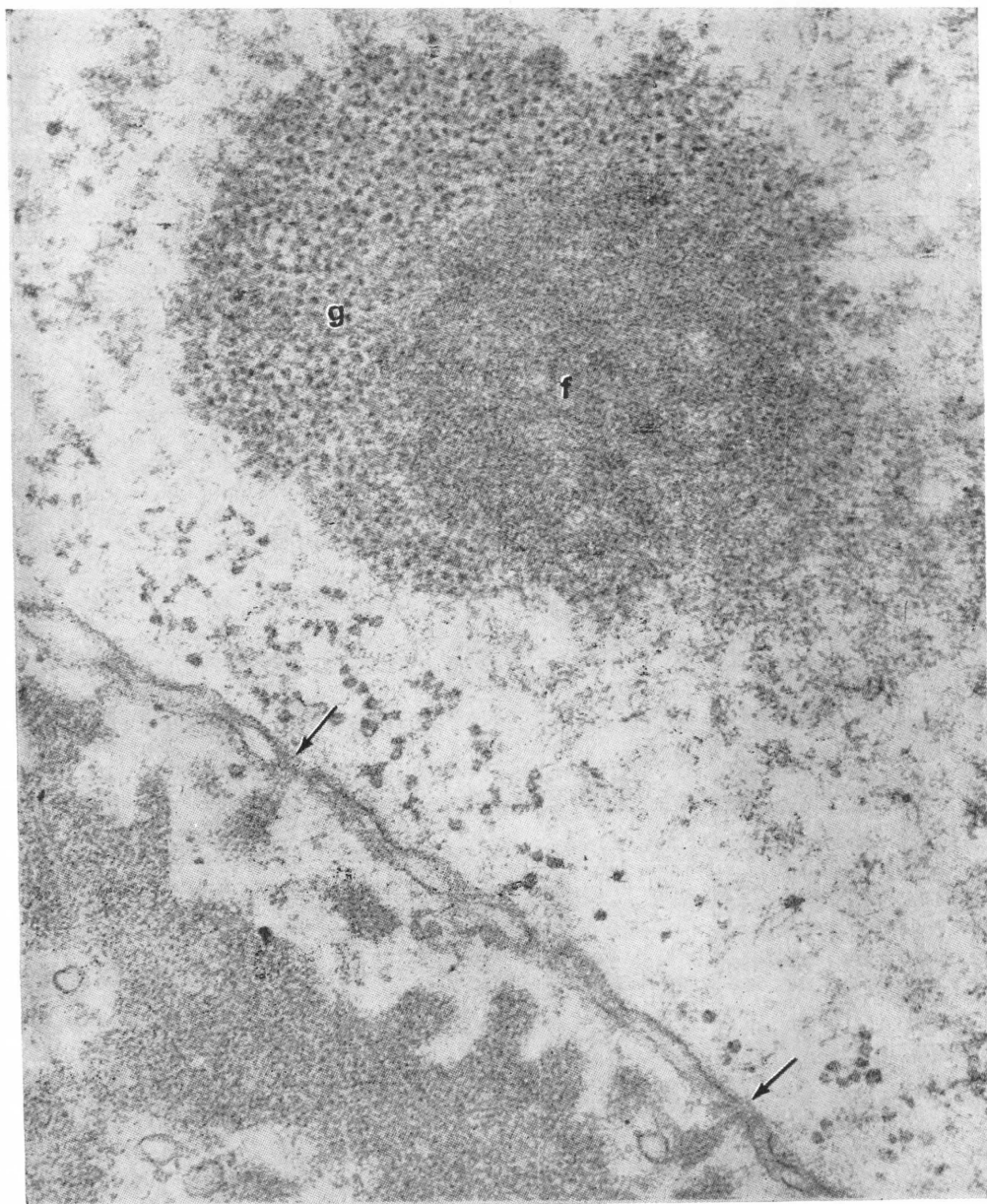


FIG. 18-11. Fotomicrografía electrónica de un ovocito de *Rana clamitans*, mostrando uno de los nucléolos periféricos, con una porción fibrilar (f) central y otra granular (g) en la periferia. Las flechas indican el material que entra en el citoplasma a través de los poros nucleares. 70,000 $\times$. (Cortesía de O. L. Miller.)

anteriormente), hace más difícil esclarecer su biosíntesis y organización dentro del ribosoma. Las denominadas proteínas estructurales o centrales están aparentemente ligadas desde los primeros estadios al ARN-r naciente, mientras que las otras proteínas se ligarían en etapas posteriores.^{36, 51}

Se ha sugerido la siguiente secuencia: proteínas de la fracción "residual" → proteínas de las partículas ribonucleoproteicas nucleares → proteínas de los ribosomas citoplásmicos. Aun en el caso de que las proteínas sean sintetizadas en el citoplasma, su armado tiene lugar en el nucléolo. Con experimentos de marcado radiactivo se demostró que el ARN 45 S está ya presente en asociación con la proteína, formando la partícula de alrededor de 80 S.⁵² Todas las transiciones entre 45 S y los 28 S y 18 S finales, ocurren dentro de partículas ribonucleoproteicas y de este modo ambas subunidades pasan al citoplasma. Diversas experiencias indican que durante la maduración de las subunidades ribosómicas existen cambios progresivos de conformación, pues comienzan con formas extendidas y filamentosas y terminan como partículas relativamente compactas.²⁸ Se ha postulado que además de la pérdida paulatina de ARN, la maduración de los ribosomas implica también la pérdida de proteínas.⁵³

Otro punto relativamente poco conocido acerca del armado del ribosoma es el proceso por el cual la síntesis de ARN ribosómico 5 S extranucleolar se coordina con la del 45 S, dando como resultado la subunidad mayor. Los genes que codifican el ARN ribosómico 5 S no se encuentran en el organizador nucleolar. Cuando se tratan células de cultivo de tejido con dosis bajas de actinomomicina D, la producción de otros ARN-r es inhibida, pero la síntesis de ARN 5 S persiste y éste es retenido en el nucleoplasma.⁵⁴ Las etapas finales de la maduración ribosómica aparentemente ocurren en forma más rápida. Se han identificado algunas subunidades ribosómicas mayores en el nucleoplasma antes que pasen al citoplasma para combinarse con ARN mensajero y constituir polirribosomas. Como ya se mencionó, las primeras en aparecer en el citoplasma son las subunidades pequeñas 40 S.⁵⁵ En células HeLa la gran subunidad 60 S puede hallarse dentro del núcleo, pero nunca se han observado ribosomas completos en su interior.⁵⁶ Las principales etapas de la síntesis y maduración del ARN ribosómico se resumen en el esquema de la figura 18-10.

Correlación entre la ultraestructura nucleolar y la biogénesis ribosómica

Hemos visto (cap. 16) que la mayor parte de los nucléolos contienen, además de la cromatina asociada al ADN, dos zonas diferenciadas: una *región granular*, con partículas de alrededor de 150 Å semejantes a los ribosomas, y una *región fibrilar*, con componentes alargados de aproximadamente 50 Å de diámetro. Ambas poseen ARN y proteínas y son atacadas por la ribonucleasa.⁵⁷ En los nucléolos pequeños de ovocitos de anfibios estas dos porciones se hallan netamente demarcadas, localizándose la región granular en la periferia, en tanto que la fibrilar constitu-

ye un núcleo central (fig. 18-11).⁵⁸ Los estudios citoquímicos sugieren que existe la siguiente relación dinámica entre las diferentes partes del nucléolo:⁵⁹

ADN nucleolar → Área fibrilar → Área granular

Si las células se marcan con uridina H³ por 5 minutos y luego se lavan (en uridina fría), el precursor es incorporado primero en la parte fibrilar y después en la zona granular.⁶⁰ Estos hallazgos permiten suponer que las fibrillas representan el precursor ribosómico 45 S del ARN.⁶¹

Demostración citoquímica del ADN-r en ovocitos

Los ovocitos de anfibios constituyen un excelente material para el estudio citoquímico y ultraestructural del nucléolo y de la biogénesis ribosómica. En ovocitos de *Xenopus*, durante el paquiteno, el exceso de ADN comienza a acumularse en forma de gránulos Feulgen positivos alrededor del nucléolo.⁶²

Este fenómeno de duplicación del ADN se acompaña de intensa incorporación de timidina-H³ (fig. 18-12, A). Posteriormente, el contenido nuclear de ADN se triplica y el ADN redundante aparece como una masa compacta desdoblada luego en cientos de pequeños gránulos que se incorporan al nucléolo.^{63, 64} (fig. 18-12, B).

En ovocitos de anfibios aplastados y tra-

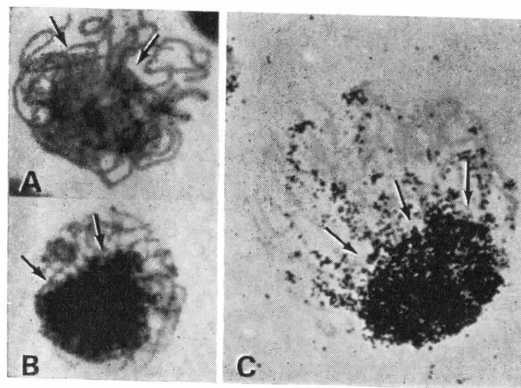


FIG. 18-12. Ovocitos de *Xenopus* durante el período de síntesis del ADN nucleolar. A En el paquiteno comienza a acumularse el exceso de ADN, en forma de gránulos, alrededor del nucléolo. B Luego, el exceso de ADN aparece como una masa densa. (A y B, reacción de Feulgen.) 1700 ×. C Ovocito más grande, en el paquiteno tardío, una vez hibridizado con ARN-H³ ribosómico. Se observa que los gránulos de plata se depositan sobre la masa del ADN redundante. 1200 ×. (Cortesía de J. G. Gall.)

tados con álcalis para lograr la separación de las cadenas polinucleótidas de ADN, fue posible producir hibridización con ARN ribosómico- H^3 . El depósito de la sustancia marcada ocurrió exactamente en la zona del núcleo que corresponde al ADN redundante.⁶⁴ (fig. 18-12, C). Esta masa contiene entre 25 y 30 pg de ADN-r, que corresponden a alrededor de 3000 organizadores nucleolares.⁶⁴

Observación con el microscopio electrónico de la transcripción ADN-r-ARN

Cuando se aíslan nucléolos de anfibios, en ciertas condiciones los componentes granulares se dispersan y las porciones fibrilares se desenrollan y expanden en círculos que semejan collares entrelazados.⁵⁸ Estas estructuras están compuestas por una molécula simple de ADN, cubierta regularmente con una ma-

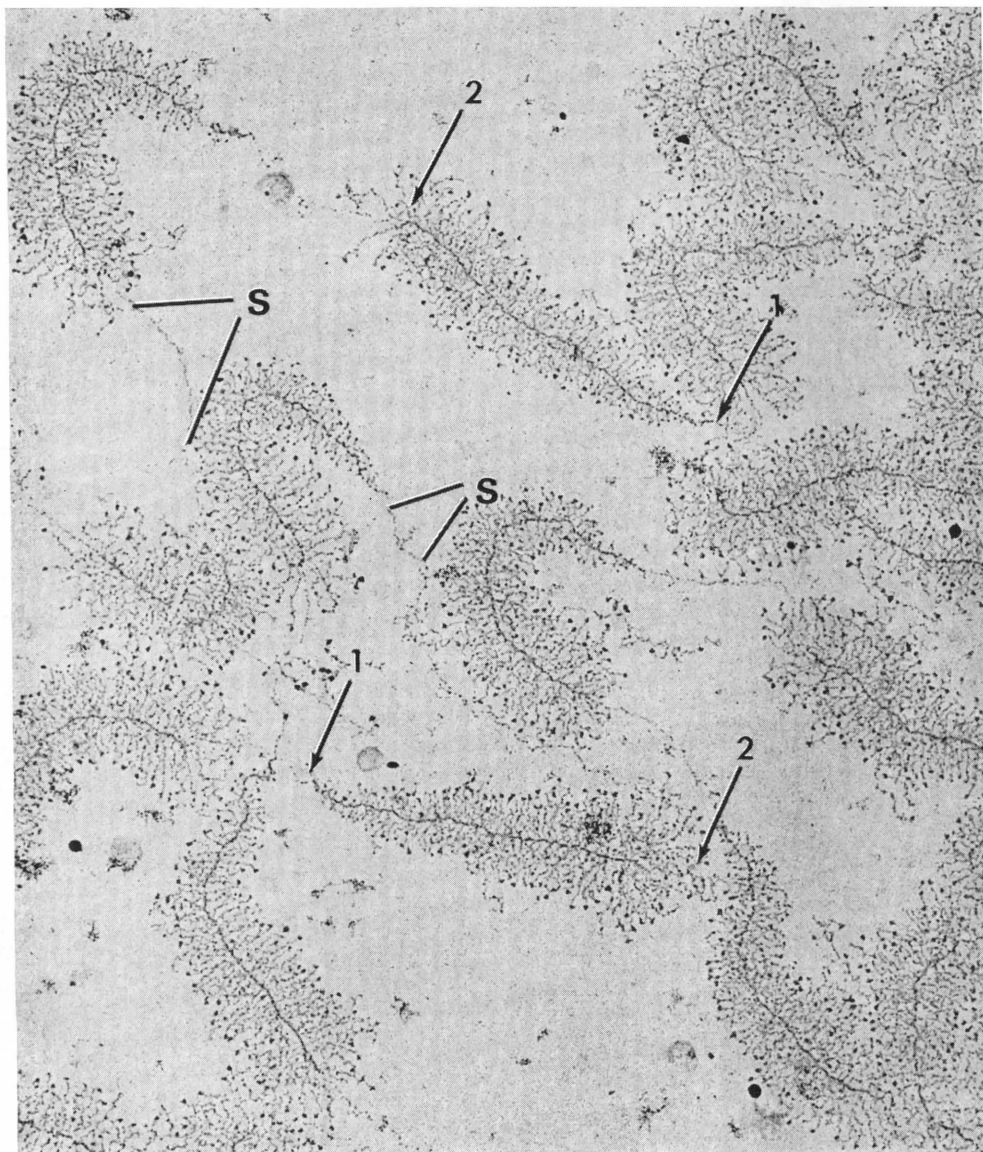


FIG. 18-13. Fotomicrografía electrónica de los genes nucleolares en el proceso de transcripción del ARN ribosómico, en los ovocitos del *Xenopus laevis*. Se aisló la porción fibrilar del nucléolo (véase fig. 18-11) y se la dispersó. La molécula de ADN posee segmentos (S) que separan regiones cubiertas de material filamentososo. Estas moléculas de ARN ribosómico crecen en longitud desde 1 a 2. 25,000 $\times$. (Cortesía de O. L. Miller y B. R. Beatty.)

triz ribonucleoproteica. Cuando el eje del ADN se estira al máximo pueden observarse con el microscopio electrónico regiones periódicas de 7 a 8 μ de longitud. La matriz cubre sólo una extensión de 4.3 a 5 μ quedando entre dichas regiones espacios carentes de ella (fig. 18-13). Este hecho sugiere que cada cistrón de ADN-r que codifica una molécula de 45 S se halla separado por segmentos de ADN no transcrito y que los cistrones "se leen", probablemente como unidades simples.⁴⁸ La matriz que cubre la molécula de ADN está compuesta de muchas moléculas ribonucleoproteicas pequeñas, casi con seguridad de ARN 45 S naciente, cuyo tamaño aumenta hacia uno de los extremos de la región transcrita (fig. 18-12). En cada cistrón de ADN-r hay por lo menos 100 ARN-polimerasas actuando al mismo tiempo, cada una de las cuales transcribe un ARN 45 S. Estas cifras junto con las aportadas por los estudios de la redundancia del ADN-r en ovocitos de anfibios (tabla 18-3), indican la enorme amplificación que puede tener lugar en la biogénesis de los ribosomas en esas células.

Pasaje de ARN-r al citoplasma

La aplicación de la ultramicrotomía en microscopía electrónica puso de manifiesto la presencia de partículas densas a ambos lados de la envoltura nuclear de diferentes células, que hicieron presumir el paso de ribosomas desde el núcleo hacia el citoplasma.⁶⁵ El transporte de partículas ribonucleoproteicas al citoplasma se evidencia fácilmente en dípteros y ovocitos de anfibios en donde aquellas pasan a través de los poros de la envoltura nuclear.

En las glándulas salivales de *Chironomus*,⁶⁶ las partículas ribonucleoproteicas atraviesan las estructuras anulares adoptando una configuración alargada, y se supone que representan ARN mensajero. Observaciones similares se efectuaron en linfocitos.⁶⁷

En el núcleo de *Amoeba proteus* existen estructuras helicoidales, de probable origen nucleolar, que trasponen asimismo los poros nucleares y se dirigen al citoplasma; contienen ARN y son considerados como ribosomas incompletos o nacientes.⁶⁸

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Küntzel, H. and Noll, H.: (1967) Mitochondrial and cytoplasmic polysomes from *Neurospora crassa*. *Nature*, 215:1340.
Miller, O. L. and Beatty, B. R.: (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science*, 164:955.

- Mozaki, A., Mizuhima, S. and Nomura, M.: (1969) Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin resistant locus in *E. coli*. *Nature*, 222:333.
Traub, P. and Nomura, M.: (1969) Mechanism of assembly of 30 S ribosomes studied in vitro. *J. molec. Biol.*, 40:391.
Ts'o, P. O. P.: (1962) The ribosomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 13:45.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Palade, G. E.: (1955) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1:59.
2. Palade, G. E. and Siekevitz, F.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:171.
3. Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:619.
4. Bonnett, H. T. and Newcomb, E. H.: (1965) *J. Cell Biol.*, 27:423.
5. Byers, B.: (1967) *J. molec. Biol.*, 26:155.
6. Watson, J. W.: (1965) *The molecular biology of the gene*. W. A. Benjamin Inc., New York.
7. Huxley, A. F. and Zubay, G.: (1960) *J. molec. Biol.*, 2:10.
8. Sabatini, D. D., Tashiro, Y. and Palade, G. E.: (1966) *J. molec. Biol.*, 22:23.
9. Shelton, E. and Kuff, E. L.: (1966) *J. molec. Biol.*, 22:23.
10. Martin, T. E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:85a.
11. Namminga, N.: (1967) *J. Cell Biol.*, 33:c1.
12. Florando, N. T.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:45a.
13. Hart, R. G.: (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 53:1415.
14. Colter, R., McPhie, P. and Gratzner, W. B.: (1967) *Nature*, 216:864.
15. Knight, E. and Darnell, J.: (1967) *J. molec. Biol.*, 28:491.
16. Comb, D. G. and Zehavi-Willner, T.: (1967) *J. molec. Biol.*, 23:441.
17. Forget, B. G. and Weissman, S. M.: (1968) *Science*, 158:1645.
18. Canter, C. R.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:478.
19. Nomura, M., Traub, P. and Bechman H.: (1968) *Nature*, 219:793.
20. Maden, B. E. A., Traub, P. R. and Munro, R. E.: (1968) *J. molec. Biol.*, 35:333.
21. Fogel, S. and Sypherd, P.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:1329.
22. Moore, P. B., Traub, R., Noller, H., Pearson, P. and Delius, H.: (1968) *J. molec. Biol.*, 31:441.
23. Traub, P. and Nomura, M.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:777.
24. Staechlin, T. H., Raskas, H. and Keselson, M.: (1967) In: *Organizational Biosynthesis Symp.*
25. Traub, P., Hosokawa, H., Craven, G. R. and Nomura, M.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:2430.
26. The nucleolus: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23.
27. Perry, R. P.: (1967) *Progr. in nucleic acid res. and molec. Biol.*, 6:219.
28. Perry, R. P.: (1969) In: *Handbook of molecular Cytology*. (A. Lima de Faria, ed.) North Holland Pub. Co., Amsterdam.
29. Miller, O. L. and Beatty, B. R.: (1959) In:

- Handbook of molecular Cytology.* (A. Lima de Faria, ed.) North Holland Pub Co., Amsterdam.
30. Maden, B. E. H.: (1968) *Nature*, 219:685.
 31. Brown, D. D. and Gurdon, J. B.: (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 51:139.
 32. Hall, B. D. and Spiegelman, S.: (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 47:137.
 33. Wallace, H. and Birnstiel, M. L.: (1966) *Biochim. biophys. Acta*, 114:296.
 34. Ritossa, F. M. and Spiegelman, S.: (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 53:737.
 35. Ritossa, F. M.: (1968) *Excerpta med. Int. Congress*, Series 166:21.
 36. Birnstiel, M. L., Wallace, H., Sirlin, J. L. and Fischberg, M.: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:431.
 37. Gall, J. G.: (1968) *Prot. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 60:553.
 38. Lima de Faria, A., Nilsson, B., Cave, D., Puga, A. and Jaworska, H.: (1968) *Chromosoma*, 25:1.
 39. Lima de Faria, A., Birnstiel, M. and Jaworska, H.: (1969) *Genetics*, 61:145.
 40. Brown, D. D.: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:297.
 41. Ritossa, F. M., Atwood, K. C., Linsley, L. and Spiegelman, S.: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:449.
 42. Quagliarotti, G. and Ritossa, F. M.: (1968) *J. molec. Biol.*, 36:57.
 43. Birnstiel, M.: (1967) *An. Rev. Plant. Physiol.*, 18:25.
 44. Ritossa, F. M., Atwood, K. C. and Spiegelman, S.: (1966) *Genetics*, 54:819.
 45. Penman, S., Smith, I., Hotzman, E. and Greenberg, H.: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:489.
 46. Willems, M., Wagner, E., Laing, R. and Penman, S.: (1968) *J. molec. Biol.*, 32:211.
 47. Weinberg, A., Loening, V., Willems, M. and Penman, S.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1088.
 48. Miller, O. L.: (1969) In: *Handbook Molec. Cytology.* (A. Lima de Faria, ed.) North Holland Pub. Co. Inc., Amsterdam.
 49. Sirlin, J. L., Jacob, J. and Kano, K. I.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 27:355.
 50. Perry, R. P.: (1963) *Exp. Cell Res.*, 29:400.
 51. Flamm, W. G. and Birnstiel, M. I.: (1964) *Exp. Cell Res.*, 33:616.
 52. Warner, J. R. and Sociro, R.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1984.
 53. Liau, M. C. and Perry, R. P.: (1969) *J. Cell Biol.*, 42:1969.
 54. Perry, R. P. and Kelly, D. E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:103a.
 55. Perry R. P.: (1965) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 18:325.
 56. Vaughan, M. H., Warner, J. R. and Darnell, J. C.: (1967) *J. molec. Biol.*, 25:285.
 57. Marinozzi, V. and Bernhard, W.: (1963) *Exp. Cell Res.*, 32:595.
 58. Miller, O.: (1966) *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23:53.
 59. Marinozzi, V.: (1964) *J. Ultrastruct. Res.*, 10:433.
 60. Genskens, M. and Bernhard, W.: (1966) *Exp. Cell Res.*, 44:579.
 61. Bernhard, W. and Granboulan, N.: (1968) In: *The nucleus*, p. 81. Academic Press, New York.
 62. Painter, T. S. and Taylor, A. N.: (1942) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 28:311.
 63. McGregor, H. C.: (1968) *J. Cell Sci.*, 3:437.
 64. Gall, J. E. and Pardue, M. L.: (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* (In press.)
 65. De Robertis, E.: (1954) *J. Histochem. Cytochem.*, 2:341.
 66. Stevens, B. J. and Swift, H.: (1966) *J. Cell Biol.*, 31:55.
 67. Pappas, G. D.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:221.
 68. Stevens, A. R.: (1967) *Machinery for exchange across the nuclear membrane*, p. 189. Prentice-Hall, Inc., New York.

Síntesis proteica y genética molecular

En el capítulo 4 se hizo el análisis citológico de la Genética. En los últimos años los estudios se centraron preferentemente en el mecanismo de la herencia al nivel molecular y, desde el punto de vista estructural, el interés ha cambiado del cromosoma al ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, que constituyen la maquinaria molecular básica de la célula.

Entre otras causas, esto último se debe al empleo, en los experimentos pertinentes, de microorganismos, que han revelado mecanismos más finos de intercambio genético. Una ventaja importante de su uso consiste en las grandes poblaciones que se obtienen por cultivo y en las condiciones experimentales precisas y reproducibles que pueden establecerse. Asimismo, es posible descubrir con mayor facilidad los cambios fenotípicos y relacionarlos con modificaciones en las enzimas y el metabolismo. Las bacterias y los virus representan el material más comúnmente empleado en estos estudios.

Las bacterias son generalmente haploides y se multiplican por simple división, transmitiendo de este modo los caracteres hereditarios; sin embargo, en algunos casos se produce en ellas la recombinación genética.

El esquema de la figura 19-1 indica los medios por los cuales el ADN es transferido de una bacteria a otra.

a) En la *transformación* (fig. 19-1, A), el ADN extraído de una cepa de bacterias penetra en otra cepa. Es incorporado como parte del ADN original del genomio y, consecuentemente, pueden aparecer algunas características fenotípicas nuevas.

b) En la *transducción*, el material genético es transportado de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago (fig. 19-1, B).

c) En la *conjugación*, hay un apareamiento y recombinación sexual entre bacterias de diferente polaridad o sexo (fig. 19-1, C).

Estos y otros procesos son utilizados frecuentemente en Genética molecular para el análisis de la recombinación.

El conocimiento adquirido con el empleo de bacterias, bacteriófagos y otros virus, y con el hongo *Neurospora* o *Aspergillus*, es aplicable a células superiores, pues en todos los organismos vivientes, a nivel molecular, existen mecanismos genéticos similares. Para ilustrar este punto comenzaremos por considerar algunos casos de enfermedades genéticas humanas cuyo origen puede ser atribuido a alteraciones moleculares en los genes y proteínas.

EXPRESIONES MOLECULARES DE LA ACCIÓN GENÉTICA

Al enunciarse por primera vez el concepto de genotipo (véase cap. 14), se llegó a la conclusión de que está contenido en los cromosomas (genomio), esencialmente en la molécula de ADN, y que constituye la suma de todas las potencialidades genéticas de un organismo. En el capítulo 17 se mencionó el proceso que conduce a la duplicación de la información del ADN, pero muy poco se dijo acerca de los mecanismos por los cuales el genotipo se expresa en el fenotipo.

Es importante ahora retomar el tema y analizar mediante qué caminos químicos un gene, que puede ser considerado una porción de la molécula de ADN, produce cambios visibles como los observados por Mendel en sus experimentos con guisantes (por ejemplo, flores rojas o blancas, semillas lisas o rugosas) o en los cruzamientos de ratas o cobayos que se ilustran en las figuras 14-1 y 14-3. Este aná-

lisis de la acción genética es muy difícil de realizar en los organismos superiores, puesto que en la mayoría de los casos la mutación de un gene da lugar a otros cambios secundarios susceptibles de enmascarar el original.

Fenilcetonuria y otras enfermedades humanas

Algunos ejemplos de enfermedades que afectan al ser humano demostrarán que la acción de los genes se cumple esencialmente por medio de un mecanismo bioquímico.

Alrededor de 1930 se descubrió que ciertos pacientes con trastornos mentales graves excretaban un compuesto anormal en la orina, el *ácido fenilpirúvico*. La enfermedad fue denominada *fenilcetonuria* y se comprobó que estaba asociada a un gene recesivo. En realidad, solo se manifiesta en individuos homocigotos recesivos, condición cuya probabilidad aumenta con los matrimonios consanguíneos (por ejemplo, primo-prima, tío-sobrina, etc.).

En la fenilacetoneuria, la fenilalanina, un aminoácido normal de la dieta, no puede ser

transformada en tirosina y es en cambio oxidada a ácido fenilpirúvico (fig. 19-2, A). El gene mutado ha conducido a la *carencia de la enzima* necesaria para el metabolismo normal. Esta es la acción primitiva del gene, pero el trastorno mental que puede conducir a la idiocia o la imbecilidad, tiene por causa la acumulación de ácido fenilpirúvico. Si la enfermedad se descubre en un período temprano, es posible prevenir, hasta cierto punto, el trastorno mental suministrando dietas pobres en fenilalanina.

Existen en el ser humano otros “errores de metabolismo” debidos a la acción genética, como *tirosinosis*, *alcaptonuria*, *cretinismo bocioso*, *albinismo*, en los cuales están comprendidos algunos bloqueos en el metabolismo de la fenilalanina y tirosina (fig. 19-2).

En la *galactosemia*, otra enfermedad hereditaria, se halla impedido el uso de galactosa por la carencia de una enzima especial, de tal modo que este azúcar se acumula en la sangre con un efecto tóxico para el organismo. Aquí también la eliminación de la galactosa (y lactosa) de la dieta mejora el cuadro. Los niños que presentan galactosemia no pueden ser alimentados con leche.

Actualmente se sabe que los genes actúan como moldes para la producción de moléculas de ARN, relacionadas con la síntesis de enzimas que controlan las diferentes etapas del metabolismo. Si ocurre una mutación, la enzima no se sintetiza más o es inactiva.

Genes y estructura de las proteínas. Anemia de células falciformes

Otro excelente ejemplo para demostrar que los genes determinan la estructura proteica es hallado en el ser humano. En las personas de raza negra se manifiesta una enfermedad hereditaria caracterizada por la presencia en la sangre venosa de glóbulos rojos semilunares. Los eritrocitos, como resultado de la menor tensión de oxígeno, experimentan un cambio en su configuración normal y adoptan la forma de hoz (fig. 19-3). Ello puede ocasionar la ruptura de la célula y producir una anemia hemolítica intensa. El estudio de la distribución familiar de esta enfermedad revela que es causada por un gene recesivo (figura 19-4). Los homocigotos recesivos tienen eritrocitos en hoz y sufren de anemia; los heterocigotos, en tanto, poseen eritrocitos falciformes sin otro síntoma destacable.

Las bases moleculares de esta enfermedad

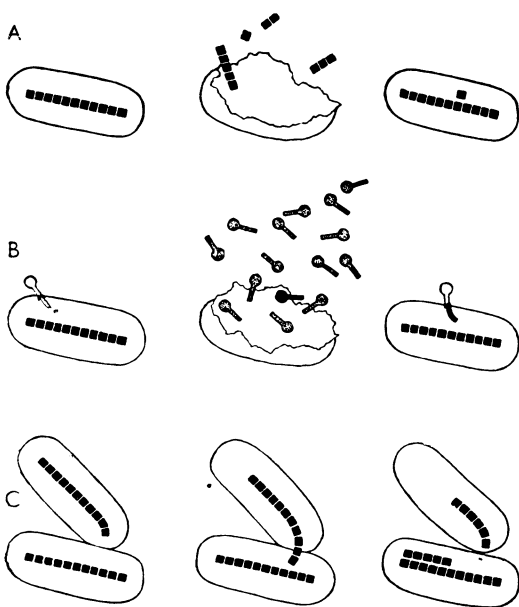


FIG. 19-1. Esquema que representa tres métodos por los cuales el material genético es transferido de una célula bacteriana a otra. A En la transformación, las bacterias son destruidas y el material genético es liberado, penetrando una pequeña parte de éste en otra bacteria. B En la transducción, los virus que infectan la célula pueden acarrear material genético de una a otra bacteria. C En la conjugación, el material genético es transferido directamente de una bacteria a otra por apareamiento y recombinación sexual.

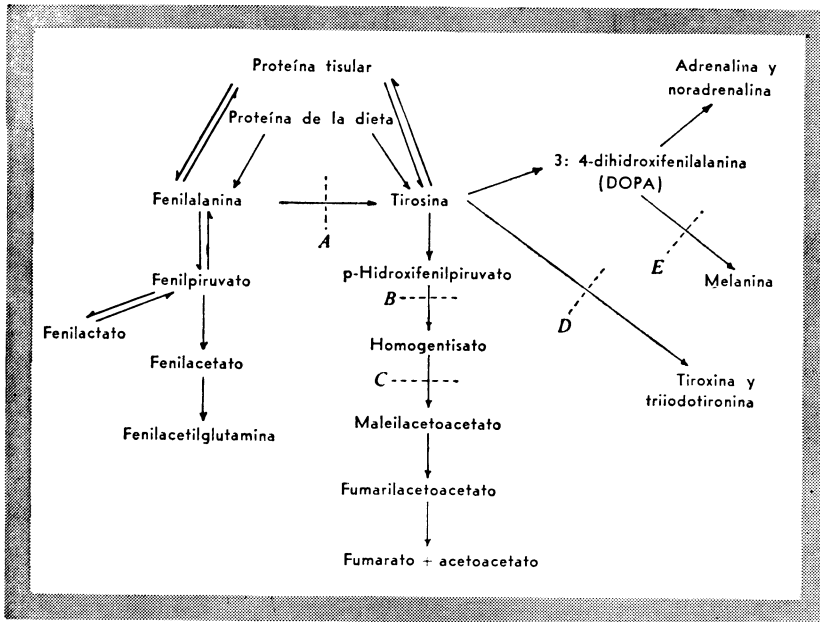


FIG. 19-2. Posibles bloqueos genéticos en el ser humano, en el metabolismo normal de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Estos bloqueos conducen a la producción de los siguientes síndromes genéticos: A, fenilcetonuria; B, tirosinosis; C, alcaptonuria; D, cretinismo bocioso, y E, albinismo. (De Harris.)

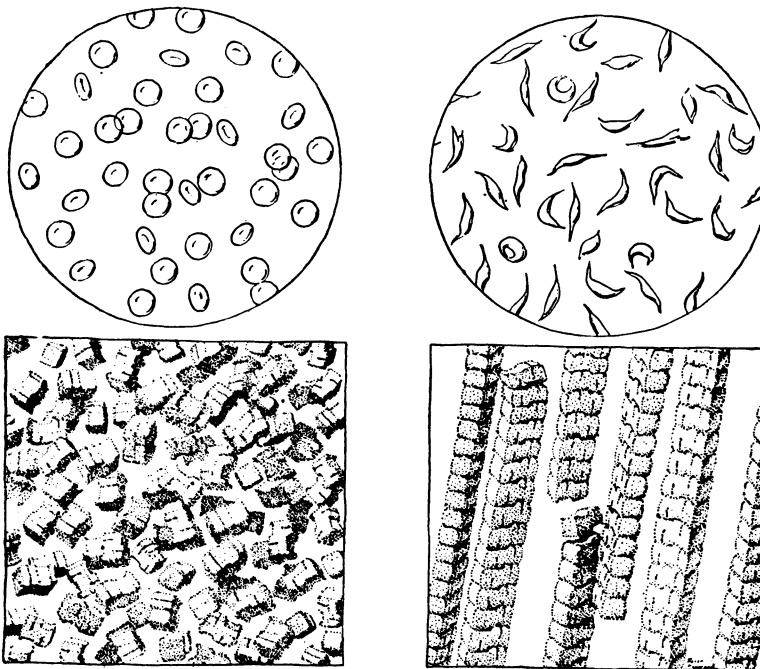


FIG. 19-3. Arriba. Izquierda: Glóbulos rojos normales. Derecha: Glóbulos rojos de la sangre venosa de pacientes con anemia de células falciformes. Abajo. Izquierda: Moléculas de hemoglobina con su orientación al azar en un individuo normal. Derecha: Moléculas de hemoglobina en la sangre venosa, en caso de anemia de células falciformes: Se orientan adoptando una forma cristalina que produce birrefringencia y deformación de los glóbulos. (De L. Pauling.)

los principales hechos vinculados con la transcripción y transporte de las moléculas de ARN que toman parte en la síntesis proteica de una célula eucarionte.

En las bacterias, este proceso es más simple pero esencialmente similar. Todas las especies de ARN que intervienen en la transcripción son copias de los correspondientes *locus* en la molécula de ADN (o genomio). Las regiones del genomio que transcriben la información específica por medio de ARN-s mensajeros se denominan *genes estructurales*, y aquellas otras que codifican los diferentes ARN-s ribosómicos y de transferencia reciben el nombre de *determinantes para el ARN*.

Las unidades fundamentales que contienen la información para codificar un solo aminoácido, llamadas *codones*, están constituidas por tres nucleótidos (tripletes). Esa información es transcrita primero en el ARN mensajero (ARN-m), que tiene una secuencia de bases complementaria de la del ADN, la cual le sirve de modelo.

El ARN-m, lo mismo que el ADN, posee sólo cuatro bases, mientras que las proteínas pueden contener hasta 20 aminoácidos. La permutación de las cuatro bases permite obtener $4^3 = 64$ tripletes (codones), cifra más que necesaria para codificar todos los amino-

ácidos. En cambio, si el código genético estuviese constituido por dobletes, el número genético de codones sería insuficiente ($4^2 = 16$). El ARN-m, a su vez, sirve como intermediario para traducir esta información en la secuencia de aminoácidos. En el proceso de traducción el ARN de transferencia (ARN-t) y los ribosomas desempeñan un papel fundamental.

Se registran múltiples evidencias genéticas de que la delección o inserción de una sola base en la molécula de ADN puede causar una *mutación puntiforme*, como en el caso mencionado anteriormente (hemoglobinas patológicas). Algunos de los *mutágenos* más poderosos son sustancias susceptibles de alterar el código genético convirtiendo una base en otra. Por ejemplo, el ácido nitroso (NO_2H) puede reemplazar al grupo NH_2 por grupos cetónicos en las bases; el 5-bromouracilo es capaz de sustituir a la timina y, en algunos casos, hasta de aparearse con la guanina.

El tamaño de un gene estructural está determinado por el mensaje que debe traducir, es decir, por el número de aminoácidos de la proteína. Así, 1500 pares de nucleótidos contienen 500 codones, que pueden codificar una proteína con 500 aminoácidos.

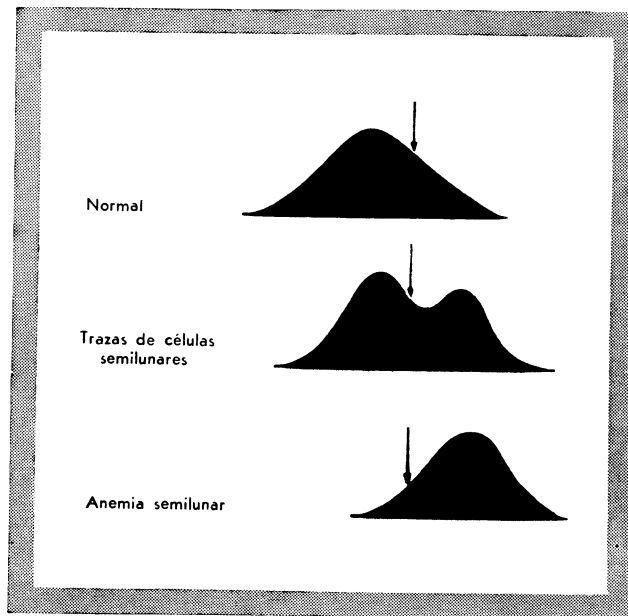


FIG. 19-5. Comportamiento electroforético de diversas hemoglobinas humanas. Homocigota normal dominante. Heterocigota con vestigios de anemia de células falciformes. Anemia de células falciformes. La flecha indica el punto de origen de la corrida electroforética. (De L. Pauling.)

ARN mensajero

La demostración de que existe un molde de ARN que transporta la información del ADN surgió de diversos experimentos de laboratorio que probaron la presencia de un ARN metabólicamente inestable en bacterias infectadas con bacteriófagos, y, también, en organismos no infectados. El término “mensajero”, propuesto por Jacob y Monod en 1961, hacía referencia al hecho de que este ARN era un molde copiado del ADN y que poseía un intercambio rápido (*turnover*). Como revela la figura 19-7, I, el ARN-m, de rápida síntesis, puede ser descubierto después de 5 segundos de incubación en presencia de uridina $-C^{14}$.³ Con períodos más prolongados (fig. 19-7, II) aquél desaparece y se marcan radiactivamente dos ARN ribosómicos.

La vida media de muchos ARN-m en *Escherichia coli* es de alrededor de 2 minutos, después de los cuales son desdoblados enzimáticamente por las ribonucleasas. En efecto, el ARN-m puede comenzar a ser “leído” en

un extremo mientras el otro se halla aún en el proceso de transcripción, así como desintegrarse en el extremo inicial simultáneamente con la finalización de la “lectura”. Sin embargo, el criterio de inestabilidad no puede ser generalizado. En células superiores se encuentran ARN mensajeros *metabólicamente estables*. Un ejemplo típico lo suministran los reticulocitos de mamíferos (glóbulos rojos inmaduros) que sintetizan hemoglobina. En este caso, el ARN-m, que fue producido en el núcleo (ahora ausente), permanece en el citoplasma y codifica la hemoglobina durante el tiempo que sea necesario. La mayor parte de los ARN-m de células hepáticas que codifican la síntesis de proteínas plasmáticas son también estables.

Otra característica del ARN-m es su *heterogeneidad* (es heterodisperso). El tamaño de la molécula varía considerablemente, puesto que se adapta al de la cadena polipeptídica que ha de codificar. En *E. coli*, el tamaño promedio de los cistrones de ARN-m oscila entre 900 y 1500 nucleótidos, correspon-

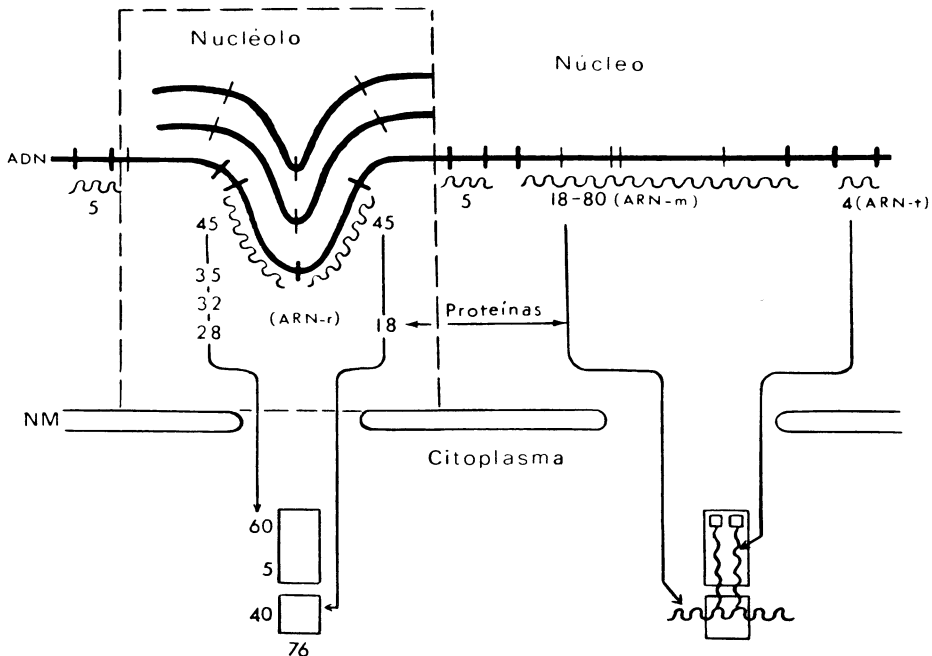


FIG. 19-6. Esquema que representa la transcripción y el transporte de los ácidos ribonucleicos nucleares y su participación en la síntesis de proteínas. Como se indicó en el capítulo 18, por una serie de pasos el ARN de 45 S da origen a los ARN ribosómicos 28 S y 18 S, los cuales entran respectivamente en las subunidades 60 S y 40 S. Cada 45 S da origen a un 18 S y a un 28 S. El ARN 5 S se forma fuera del nucléolo y luego entra en la subunidad 60 S. También se indican sitios de genoma donde se hace la transcripción del ARN de transferencia (ARN-t) y del mensajero (ARN-m). NM, membrana nuclear. (Cortesía de W. Bernhard.)

diente a 300 a 500 aminoácidos. A menudo existen ARN mensajeros mucho mayores, debido a que varios cistrones adyacentes son copiados al mismo tiempo. Se trata de los denominados mensajeros *poligénicos* o *poli-cistrónicos*. Por ejemplo, las diez enzimas específicas que intervienen en el metabolismo de la histidina son susceptibles de ser codificadas por la misma molécula de ARN-m. Aunque se encuentran ARN-m de peso molecular muy alto en células superiores, algunos de ellos pueden ser monocistrónicos. Así, la hemoglobina es codificada por dos genes estructurales (α y β).

En el capítulo 17 se puntualizó que en las células superiores no todo el ARN heterogéneo era ARN-m y que existe una fracción nucleoplásmica y otra citoplásmica que no pue-

den considerarse como verdaderos ARN-m. El ARN-m es *complementario* del ADN cromosómico y forma híbridos ARN-ADN después de separar las dos cadenas de ADN (véase cap. 4). La síntesis de ARN-m se verifica a partir de *una sola de las dos cadenas de ADN* que le sirven de molde. La enzima *ARN-polimerasa* une los ribonucleótidos catalizando la formación de uniones 3'-5'-fosfodiéster, que constituyen la armazón del ARN. En esta síntesis el cociente AU:GC del ARN es similar al cociente AT:GC del ADN. Se halla perfectamente demostrado en la actualidad que la síntesis de ARN-m se inicia en el extremo 5'-OH, y que la dirección de crecimiento es de 5' a 3'. La ARN-polimerasa se ubica en un *sitio iniciador* del gene estructural y cataliza la síntesis de ARN-m hasta que se alcanza el

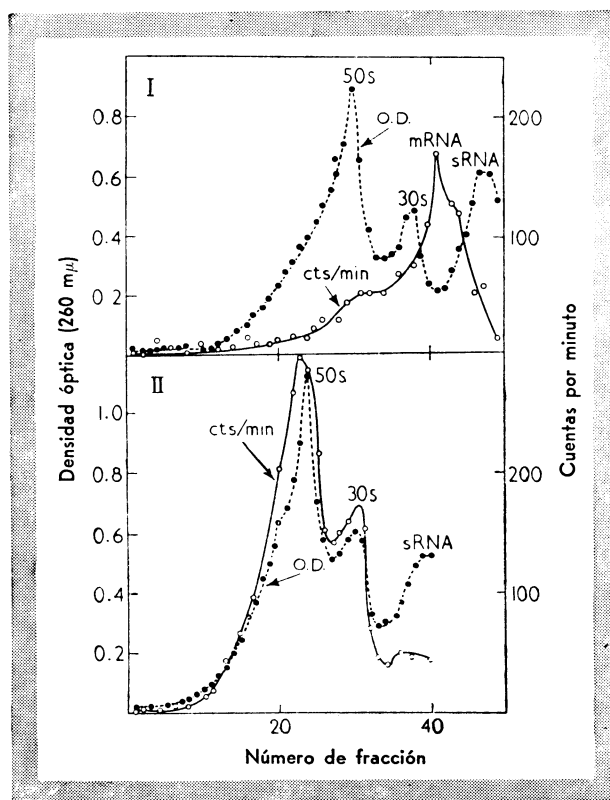


FIG. 19-7. Esquema que muestra el rápido intercambio del ARN mensajero. Se incubaron bacterias *E. coli* durante 5 segundos con uridina $-C^{14}$ y luego se lavaron en uracilo no radiactivo. En I, las células fueron congeladas rápidamente, y en II se incubaron durante 15 minutos a $37^{\circ}C$, antes de la congelación. Los ácidos ribonucleicos fueron extraídos en ambos experimentos y se ultracentrifugó. La densidad óptica a $260\text{ m}\mu$ indica la concentración de las diferentes moléculas de ARN, y las cuentas por minuto señalan la incorporación de la uridina $-C^{14}$. Obsérvese que en I el único ARN marcado es el ARN-m, mientras que en II se encuentra la radiactividad en dos picos de ARN-r (50 S y 30 S) y en el ARN-s. (De Gross y col., 1961.)

sitio de terminación. La figura 19-8 pone de manifiesto las dos cadenas de ADN dispuestas en forma antiparalela o polarizada (A y B), así como el ARN-m (C), que es copiado en la secuencia $5' \rightarrow 3'$. Otro criterio para reconocer el ARN-m es que se liga rápidamente a los ribosomas constituyendo parte de los polirribosomas (véase más adelante).

En resumen, la identificación del ARN-m se basa en las siguientes propiedades: su rápido intercambio, su heterogeneidad, la composición de bases complementarias a la del ADN, y su capacidad para unirse a los ribosomas. La función más importante que cumple es servir como molde para la síntesis proteica.

Informosomas. En las células de eucariontes el ARN-m puede tener alto grado de estabilidad y persistir por largos períodos sin ser degradado. Hay evidencia de que el ARN-m no penetra en el citoplasma como simples cadenas de ARN, sino de que lo hace asociado con las proteínas.⁴⁻⁶ Spirin propuso el término *informosoma* para designar este complejo ARN-m-proteína. Los primeros estudios fueron realizados en células embrionarias de peces y de erizo de mar, en los estadios iniciales de segmentación, durante los cuales no se sintetiza ARN ribosómico (ARN-r) (véase cap. 20). Marcando el ARN con uridina y utilizando formaldehído para estabilizar los complejos ribonucleoproteicos se encontraron partículas que sedimentaban por arriba o por debajo de los ribosomas (80 S). Dichas partículas tienen un cociente proteína-ARN de 4:1 y una densidad de flotación de 1.4 (en comparación con la de 1.55 que presentan los ribosomas). Se hallan, por tanto, *informosomas* grandes, de más de 80 S, que contienen una enorme molécula de ARN-m de 35 S, e *informosomas* más pequeños, de menos de 80 S. Partículas similares se encontraron en los hepatocitos y en células cancerosas HeLa, así como en sus núcleos.

Los *informosomas* se interpretan como complejos proteína-ARN-m, que pueden ser usados si ocurren demoras en la traducción. Esto sucede, por ejemplo, cuando en el embrión la expresión genética tiene lugar más tarde, en la organogénesis. Otras interpretaciones asignan un papel protector a las proteínas, que impedirían que el ARN-m fuese degradado por

las ribonucleasas celulares. Se ha sugerido que la proteína sería también necesaria para el reconocimiento de los ribosomas, debido a que cuando el ARN-m es purificado tiende a perder sus funciones de molde. La proteína podría asimismo "enmascarar" reversiblemente el ARN-m, controlando de este modo la síntesis a nivel de la traducción. De ello resultaría una regulación o modulación de la síntesis proteica.

ARN de transferencia

Los ARN de transferencia (ARN-t) o solubles constituyen un grupo de pequeños ácidos ribonucleicos que se combinan con los distintos aminoácidos y que pueden reconocer los codones del ARN-m. La necesidad de que exista esa molécula de ARN-t (adaptador) se comprende fácilmente, teniendo en cuenta que no hay afinidad específica entre los grupos laterales de muchos aminoácidos y las bases del ARN-m. Esta etapa fundamental de la traducción es realizada: a) por enzimas activadoras aminoácido-específicas, que unen los distintos aminoácidos a un extremo de la molécula del ARN-t correspondiente, y b) por tripletes específicos de bases (anticodones) que son capaces de ligarse mediante puentes de hidrógeno con los correspondientes codones del ARN-m. A cada uno de los 20 aminoácidos naturales le corresponde uno o más ARN-t específicos. El ARN-t representa del 10 al 15 por ciento del ARN total en *E. coli*. Cada ARN-t tiene una constante de sedimentación de 4 S y contiene alrededor de 80 nucleótidos (peso molecular $\sim 25,000$ Daltons). Ciertas porciones de la cadena de nucleótidos pueden ser comunes a todos los ARN-t. Otro detalle interesante es que existe apareamiento de bases entre algunas de ellas, como se indica en la figura 19-9, que representa una de las configuraciones de mayor aceptación (modelo en hoja de trébol).⁷ El extremo $3'$ de la cadena siempre

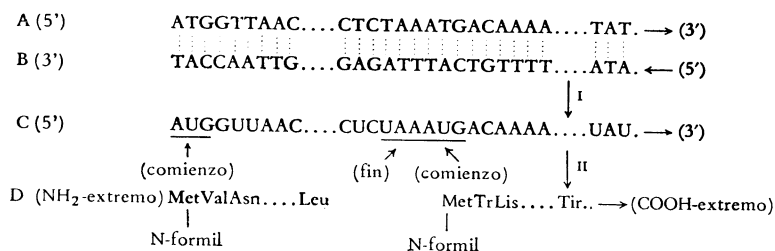


FIG. 19-8. Esquema que ilustra la transcripción y trasducción en la información genética. I Transcripción y II, trasducción. A Cadena de ADN $5' \rightarrow 3'$; B, cadena de ADN $3' \leftarrow 5'$; C, ARN mensajero policistrónico $5' \rightarrow 3'$ copiado de B; D, cadenas polipeptídicas. Los codones de iniciación y terminación están subrayados. (Cortesía de S. Ochoa.)

termina en la secuencia CCA, mientras que el extremo 5' es G. En el primero se produce la unión con el aminoácido, constituyéndose el aminoacil-trasfer-ARN. Otras porciones del ARN-t se indican en la figura 19-9. El denominado *anticodón* contiene tres bases no apareadas que reconocen las bases complementarias del ARN-m. Éste es el extremo más específico de la molécula y el que tiene a su cargo la lectura del mensaje. En el ARN-t se halla también un sitio de *reconocimiento del ribosoma*, propio de toda esta familia de moléculas, y un sitio relacionado con el *reconocimiento de la enzima activadora de aminoácidos*.

En resumen, en una molécula de ARN-t se distinguen: a) el sitio de unión para el aminoácido; b) el sitio de reconocimiento del codón (anticodón); c) el sitio específico para reconocer la enzima activadora del aminoácido, y d) el sitio de reconocimiento del ribosoma.

Otra característica del ARN-t es la presencia de algunas bases poco comunes, muchas de las cuales están metiladas. Entre ellas se incluyen: la pseudouridina (abreviatura: ψ), metilguanina, metilaminopurina, metilcitosina,

timina, ácido inosínico, etcétera (el ácido inosínico presenta, en cuanto al apareamiento de sus bases, las mismas propiedades que la guanina). El primer análisis completo de la secuencia de nucleótidos fue realizada en el ARN-t de la alanina, encontrándose 77 nucleótidos en su cadena.⁷ Posteriormente se determinaron las secuencias de los ARN-t de la tirosina,⁸ serina⁹ y N-formil-metionina.¹⁰ En el presente se conoce la secuencia de alrededor de catorce ARN-t (Philipps, 1969).

TABLA 19-2 Codones en el ARN mensajero y los aminoácidos codificados. Con (*) se indican aquellos codones que fueron determinados mediante polinucleótidos sintéticos. Con mayúsculas están los aminoácidos con mayor capacidad de fijación. Met es el codón utilizado para la iniciación de la síntesis de proteína (N-formil-Met-ARN-t). Term significa posibles codones terminales (De M. Nirenberg 1968.)

Secuencias de nucleótidos en los codones

1 ^a base		2 ^a base		3 ^a base	
U		C	A	G	
U	PHE*	SER*	TYR*	CYS*	U
	PHE*	SER*	TYR*	CYS	C
	leu*?	SER	TERM?	cys?	A
	leu*, f-Met	SER*	TERM?	TRP*	G
C	leu*	pro*	HIS*	ARG*	U
	leu*	pro*	HIS*	ARG*	C
	leu	PRO*	GLN*	ARG*	A
	LEU	PRO	gln*	arg	G
A	ILE*	THR*	ASN*	SER	U
	ILE*	THR*	ASN*	SER*	C
	ile*	THR*	LYS*	arg*	A
	MET*, F-MET	THR	lys	arg	G
G	VAL*	ALA*	ASP*	GLY*	U
	VAL	ALA*	ASP*	GLY*	C
	VAL*	ALA*	GLU*	GLY*	A
	VAL	ALA	glu	GLY	G

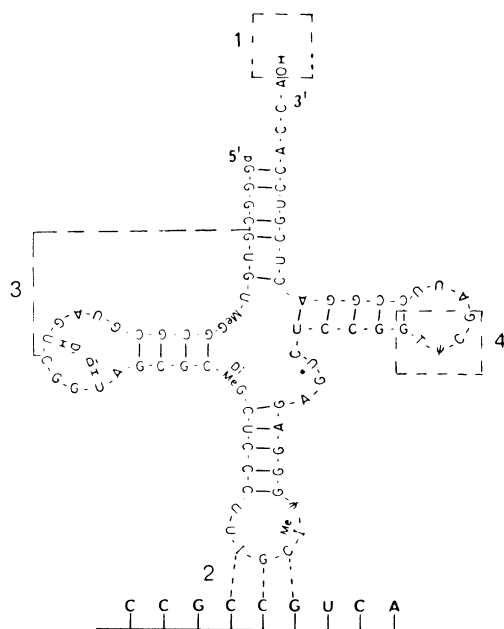
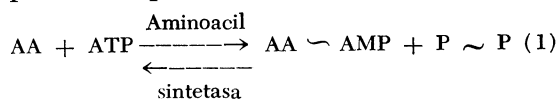


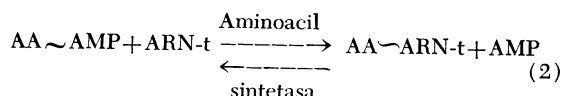
FIG. 19-9. Esquema del ARN-t para la alanina. 1 Sitio de unión del aminoácido; 2, anticodón unido por puentes de hidrógeno al codón de alanina (CCG); 3, región que reconoce la enzima activadora de la alanina; 4, región que reconoce al ribosoma y que es común a todos los ARN-t.

Formación del complejo aminoacil-trasfer-ARN. Cada aminoácido cuenta con una enzima específica encargada de la activación del grupo carboxilo (de ese aminoácido) para su unión con el residuo adenílico del ARN-t. La primera etapa de la reacción utiliza el ATP:



El AA ~ AMP hace las veces de intermediario, permaneciendo ligado a la enzima hasta la llegada del ARN-t específico, que es

cuando ocurre la formación del complejo AA ~ ARN-t.



A fin de llevar a cabo esas dos funciones, la enzima activadora posee dos sitios: uno para reconocer el aminoácido y otro para reconocer el ARN-t específico.

Código genético

Las unidades de información contenidas en el ARN-m son los *codones*, constituidos por tripletes de bases. Ahora que el código genético está prácticamente dilucidado (tabla 19-2), es interesante recordar algunos de los experimentos fundamentales que hicieron posible su conocimiento. En 1961, Nirenberg y Matthaei¹¹ realizaron una observación trascendental: los polirribonucleótidos sintéticos pueden actuar como ARN-m artificiales y estimular la incorporación de aminoácidos en las uniones peptídicas. Utilizando ácido poliuridílico (poli-U), el resultado obtenido fue la codificación de la polifenilalanina (cadena peptídica de fenilalanina). Se interpretó entonces que el codón de la fenilalanina era el UUU. El uso de ARN-s sintéticos de composición conocida fue posible gracias al hallazgo previo de Ochoa, según el cual la enzima *polinucleótido-fosforilasa* es capaz de unir los nucleótidos presentes en el medio.^{12, 13} Ya en 1963, los experimentos con ARN-s sintéticos realizados en los laboratorios de Nirenberg y Ochoa¹⁴ habían permitido establecer la mayor parte de las secuencias de los codones. En estos experimentos se empleaba un sistema libre de células formado por: a) ribosomas; b) el sobrenadante conteniendo enzimas activadoras, ARN-t y otros factores entonces desconocidos; c) ATP, GTP y aminoácidos marcados, y d) ARN-m sintético. La cantidad de síntesis se determinó por la radiactividad hallada en el precipitado proteico. Con posterioridad, se reconocieron codones mediante el uso de moldes de trinucleótidos de bases conocidas.¹⁵ Cuando los ribosomas se incuban con AA-ARN-t-C¹⁴ y esos trinucleótidos, se forman complejos fácilmente separables por medio de la filtración. En el laboratorio de Khorana, fueron sintetizados polidesoxirribonucleótidos y polirribonucleótidos con dobles o tripletes de secuencias conocidas en sistemas libres de células.^{16, 17} Ello permite, no

sólo estudiar el código genético, sino también obtener la síntesis parcial de moléculas de ADN, abriendo la posibilidad de que sean sintetizados los propios genes.

Como se aprecia en la tabla 19-2, varios codones de ARN pueden servir de información para un mismo aminoácido (por ejemplo, la leucina puede ser codificada por CUU, CUC y CUA). En muchos casos, los codones sinónimos difieren únicamente por la base que ocupa la tercera posición del triplete. Este hecho es denominado *degeneración del código genético*. Las dos primeras bases del codón parecen ser más importantes en el proceso de codificación. Puesto que el mismo aminoácido es codificado por codones sinónimos, es lógico suponer que las mutaciones causadas por el reemplazo de la tercera base no se manifiesten (sean silenciosas). La figura 19-8, C, demuestra que la lectura del mensaje tiene lugar en la dirección 5' → 3' del ARN-m. La cadena polipeptídica se forma siempre desde el extremo que posee un grupo NH₂ libre hacia el que presenta el grupo COOH (fig. 19-8, D). Se sabe también que existen señales especiales para el comienzo y finalización de la lectura de los cistrones individuales. En bacterias, el AUG es el *codón iniciador* que lleva a la incorporación de la N-formilmetionina (véase más adelante). En la figura 19-8, D, el UAA representa un *codón de terminación* o de liberación, situado inmediatamente antes del AUG, que es el iniciador de la lectura del nuevo cistrón.¹⁸ Otros tripletes de terminación o "sin sentido" son el UGA y el UAG.

Aunque el código genético es conocido sobre todo por las experiencias realizadas en *E. coli*, se obtuvieron resultados esencialmente similares en otros sistemas, como en anfibios o en hígado de mamíferos. De modo, pues, que el *código genético es fundamentalmente universal*, o sea, es el mismo para todos los organismos vivos. Como indica Nirenberg,¹⁵ el código genético puede haber comenzado junto con la primera bacteria, tres mil millones de años atrás, y desde entonces haber cambiado relativamente poco a través de la evolución biológica (véase, también, Ochoa, 1967).

Ribosomas y síntesis proteica

Mientras que hasta hace algunos años el ribosoma parecía ser una estructura más bien inerte, en la cual tenía lugar la síntesis pro-

teica, los estudios recientes ponen de manifiesto que posee una participación muy activa e importante. El ribosoma debe ser capaz de reconocer y guiar las interacciones múltiples de gran cantidad de moléculas, entre las cuales se incluyen: el aminoacil-trasfer-ARN, el peptidil-trasfer-ARN y otros numerosos factores que intervienen en la iniciación, alargamiento y terminación de la cadena polipeptídica. También participan en el sostén y desplazamiento del ARN-m que lleva el mensaje genético. Los conceptos acerca de la estructura y biogénesis de los ribosomas son indispensables para comprender su papel en la síntesis proteica. El ribosoma puede ser considerado como una maquinaria macromo-

lecular, con sus partes muy precisamente interrelacionadas, que selecciona y preside el proceso de traducción (Stachelin y col, 1967).

Polirribosomas y síntesis proteica

Las primeras observaciones efectuadas con el microscopio electrónico en cortes de células demostraron que los ribosomas se asocian en grupos, formando en ocasiones figuras recurrentes (fig. 18-1). Sólo en 1962 se esclareció la función de estos *polirribosomas* o *polisomas* en la síntesis proteica.^{19, 20} Después de tratar reticulocitos con aminoácidos marcados y usando métodos de separación suaves (por ejemplo, lisis en soluciones hipotónicas), se descubrió que además de las bandas de

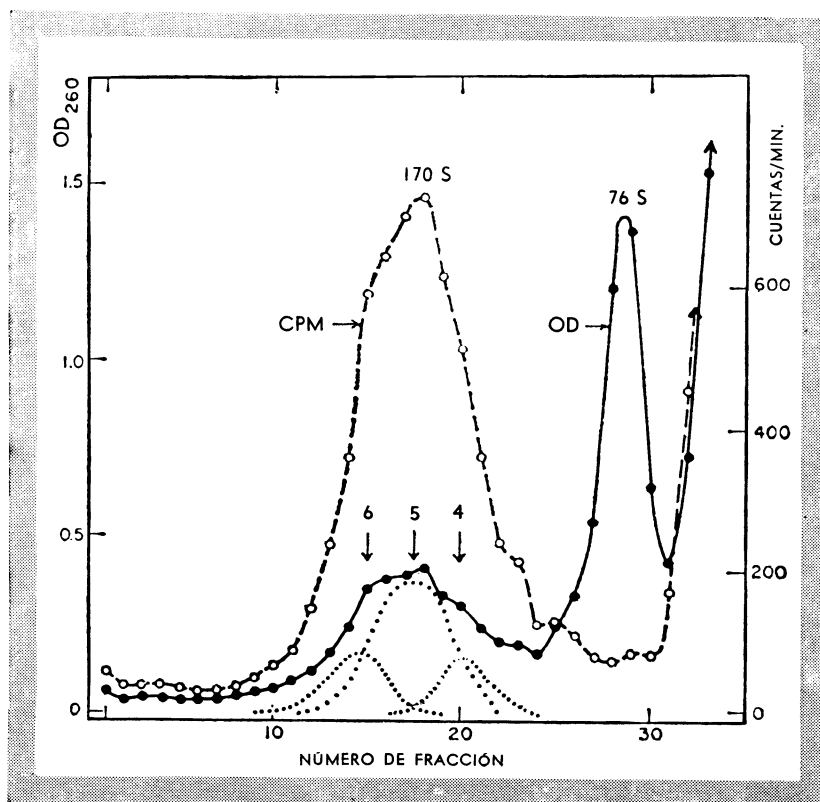


FIG. 19-10. Experimento realizado para demostrar que la síntesis de la hemoglobina se produce en los polirribosomas. Los reticulocitos fueron incubados durante 45 segundos en presencia de una combinación de aminoácidos marcados con C^{14} . Luego se hemolizaron osmóticamente y la parte soluble (hemoglobina) fue centrifugada durante 2 horas en un gradiente de densidad continua de sacarosa. Después se hizo un orificio en el fondo del tubo y se recogieron 30 fracciones que fueron observadas con el microscopio electrónico. En las fracciones correspondientes se determinó la densidad óptica a 2600 Å para el ARN y la radiactividad. Mientras la densidad óptica (OD) muestra un pico a 76 S (constante correspondiente a ribosomas aislados), el máximo de radiactividad corresponde a los tetrámeros, pentámeros y hexámeros ribosómicos indicados con las flechas. (De J. R. Warner, A. Rich y C. E. Hall.)

sedimentación características de los ribosomas aislados (76 S en la figura 19-10), existían unidades de mayor tamaño, entre 108 y 170 S. Al mismo tiempo, la máxima radiactividad, indicadora de la síntesis de hemoglobina, se hallaba en la fracción 170 S, que corresponde a un polirribosoma de cinco unidades (pentámero). Por medio de la microscopía electrónica se confirmó que cerca del 75 por ciento de los ribosomas del pico de 170 S eran pentámeros. El filamento delgado presente entre los ribosomas fue interpretado

como ARN-m (fig. 19-11). En estos polirribosomas, la distancia entre los centros de los ribosomas individuales es de alrededor de 340 Å, y la longitud total del ARN-m aproximadamente de 1500 Å.

El número de ribosomas en los polirribosomas varía de manera considerable, lo que parece estar relacionado con la longitud del ARN-m que tiene a su cargo la "lectura" en el proceso de traducción.

En el caso de la molécula de hemoglobina existen cuatro subunidades de polipéptidos de 16.000 de peso molecular, cada una de las cuales contiene 150 aminoácidos. Si cada aminoácido está determinado probablemente por tres nucleótidos del ARN-m y la distancia entre los nucleótidos es de 3,4 Å, es evidente que una molécula de ARN-m de 1500 Å contiene la información necesaria para formar una cadena polipeptídica de hemoglobina de 16.000 de peso molecular. Por el mismo razonamiento, se emplearán 8 a 12 ribosomas en una cadena de 900 nucleótidos (ARN-m de 300.000 de peso molecular) para hacer una proteína de 35.000 de peso molecular, y 20 ribosomas (ARN-m de 600.000 de peso molecular) para una molécula proteica de 70.000 de peso molecular.

En *E. coli* y en células de embrión de pollo se han observado polirribosomas constituidos por cerca de 50 unidades,²¹ los cuales pueden encontrarse libres en la matriz citoplásmica o adheridos a las membranas del retículo en-

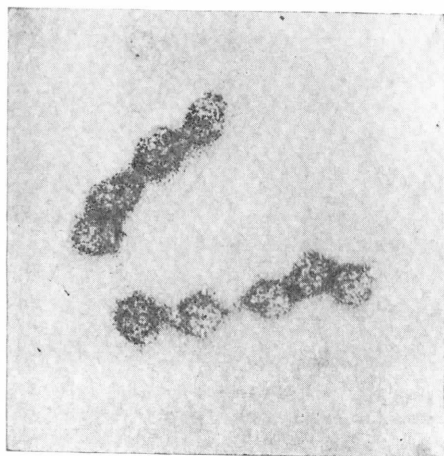


FIG. 19-11. Polisomas libres separados de hígado de rata. Coloración negativa con acetato de uranilo, 250,000 X. (Cortesía de Y. Nonomura, G. Blobel y D. Sabatini.)

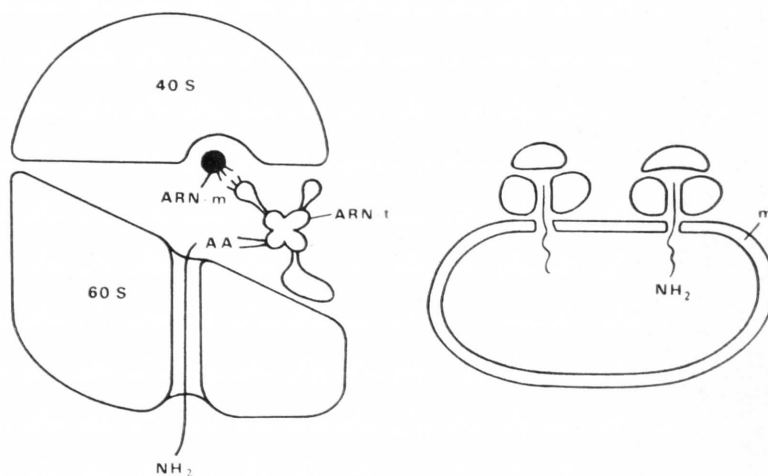


FIG. 19-12. *Izquierda*. Esquema de un ribosoma mostrando las dos subunidades y la probable posición del ARN-m y del ARN-t. La cadena polipeptídica naciente atravesaría una especie de túnel en la subunidad grande. *Derecha*. Esquema de la relación entre los ribosomas y la membrana del retículo endoplásmico. Obsérvese la entrada de la cadena polipeptídica en la cavidad. (Cortesía de D. Sabatini y G. Blobel.)

doplásmico (fig. 18-1). Respecto de los polirribosomas libres, se les ha atribuido una configuración en hélice, en la que las subunidades pequeñas se disponen en el eje central y las grandes periféricamente.²² Esa disposición fue confirmada en cortes de diversos tipos celulares.²³

En el polisoma, el ARN-m estaría situado entre las dos subunidades ribosómicas (figura 19-12). Ello podría explicar la razón por la cual aproximadamente 25 nucleótidos del ARN-m son protegidos de la acción de ribonucleasas exógenas cuando aquél se halla en el polisoma.

Ciclo ribosoma-polisoma. Asociación y disociación de subunidades

A pesar de que hasta hace muy poco se pensaba que las diferentes especies moleculares relacionadas con la síntesis proteica uníanse directamente a los ribosomas completos, las experiencias actuales indican que las dos subunidades ribosómicas se pueden asociar durante el proceso sintético, para disociarse de nuevo al finalizar éste.²⁴ Los pasos esenciales del ciclo ribosómico están indicados en la figura 19-13, donde se evidencian diferentes subunidades ribosómicas (30 y 50 S en *E. coli*) y un polirribosoma con sus extremos inicial y terminal.²⁵ En *i* se ven entrar dos subunidades distintas en el ribosoma (las subunidades negras pertenecen a ribosomas pesados, marcados con C¹³, N¹⁵ y deuterio, mientras que las blancas contienen los átomos normales C¹², N¹⁴ y H). Al finalizar el ciclo en *t*, aparecen dos unidades desprendiéndose e incorporándose al pool de subunidades. De acuerdo con este concepto, las subunidades de diferentes ribosomas son susceptibles de intercambiarse durante el ciclo ribosómico.²⁶

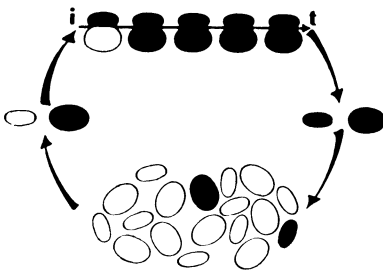


FIG. 19-13. Ciclo ribosómico de la síntesis de proteínas. (De R. Kaempfer.)

Dicho intercambio también ocurre en células eucariontes. En reticulocitos la combinación de las subunidades 40 y 60 S se produciría al comienzo de la síntesis, disociándose a su término.²⁷ Hallazgos similares se hicieron en levaduras (Kaempfer, 1969).

En hepatocitos normales, la mayor parte de los ribosomas forman polisomas, y sólo una pequeña proporción constituye las subunidades (60 y 40 S) y los ribosomas libres (80 S).

Sin embargo, por acción de la puromicina o de la etionina, los polisomas se desintegran y las subunidades y los ribosomas libres se acumulan. La etionina es antagonista de la metionina en la trasmetilación y ocasiona una deficiencia de adenina y descenso del ATP. El efecto de esta droga es reversible en el lapso de pocas horas (Farber y col., 1969).

Factor de disociación. En el ciclo ribosómico de la *E. coli* se halló un factor de disociación de naturaleza proteica, necesario para la separación de las subunidades 50 y 30 S al finalizar la lectura (Subramanian y col., 1968). Puede ser extraído de la subunidad 30 S y sería idéntico al factor de iniciación F₃ que interviene en la unión del ARN-m con la subunidad 30 S (tabla 19-3). Se ha sustentado un modelo del ciclo ribosoma-polisoma, en el cual el factor de disociación separa el ribosoma 70 S uniéndose a la subunidad 30 S. Este factor se liberaría en una etapa posterior, en cuyo transcurso tiene lugar la reasociación de las subunidades 30 y 50 S, reanudándose el ciclo (fig. 19-14). Recientemente se obtuvieron evidencias que apoyan este modelo (Algranti y col., 1969).

Papel de la subunidad 30 S en el complejo de iniciación. Los resultados antedichos sugieren que las dos subunidades ribosómicas pueden tener diferentes funciones. Para la lectura del mensaje genético, el ARN-m se une a la subunidad 30 S. El primer paso se

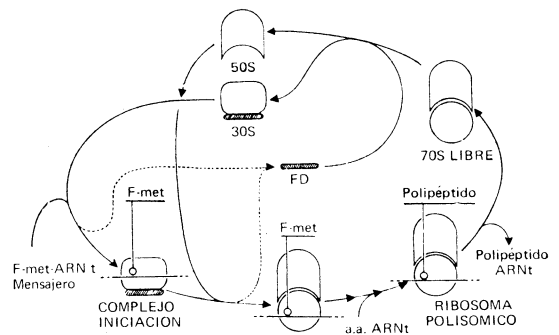


FIG. 19-14. Ciclo ribosoma-polisoma en el que se indica el papel del factor de disociación (FD). (Véase la descripción en el texto.) (De A. R. Subramanian, E. Z. Ron y B. D. Davies.)

ría la unión entre la pequeña subunidad 30 S y el primer codón del ARN-m, formándose el *complejo de iniciación*.²⁸ A ello sigue la unión del primer aminoacil-trasfer-ARN y después el apareamiento de la subunidad 50 S (figura 19-15).

En bacterias se demostró que el primer aminoacil-trasfer-ARN, que inicia la síntesis, es una variedad especial que posee un derivado fomilo (CHO) de la metionina,²⁹⁻³³ codificado por el triplete AUG (codón; tabla 19-2). Éste se encontraría presente al comienzo de cualquier molécula de ARN-m.

Puesto que en la síntesis proteica la cadena peptídica crece siempre desde el extremo terminal NH₂ hacia el grupo COOH, la función de la formilmetionina-trasfer-ARN (F-met-t-ARN) es asegurar que las proteínas se sintetizan en esa dirección. En la F-met-t-ARN, el NH₂ está bloqueado por el grupo fomilo, dejando sólo el COOH para reaccionar con el NH₂ del segundo aminoácido (fig. 19-8).³⁰ El primer aminoácido es luego separado de la proteína por una enzima hidrolítica.³¹ La F-met-t-ARN no existe en las células eucariontes, aunque fue hallada en las mitocondrias (Smith y Marcker, 1968).

Iniciación de la síntesis proteica

Además de las aminoacil-sintetasas (ARN, GTP y ATP), hay otros factores proteicos asociados con la iniciación de la síntesis proteica, el alargamiento de la cadena y su terminación. En el capítulo 18 se mencionó que dos de las proteínas de la subunidad 30 S estaban relacionadas con el complejo de iniciación. En el laboratorio de Ochoa se aislaron tres factores de iniciación (F₁, F₂ y F₃), lavando los ribosomas con ClNH₄ y efectuando cromatografía en columna.³²⁻³⁷ Dichos factores son proteínas ligadas débilmente a la subunidad 30 S, que pueden desprenderse por medio del lavado con ClNH₄. El factor F₂ posee un peso molecular de 80.000 Daltons, y contiene grupos SH, de los cuales depende la unión con el GTP (figura 19-13). El factor F₁ es una proteína básica de 8000 Daltons vinculada con la unión de la F-met-t-ARN. El factor F₃, cuyo peso molecular es de 30.000 Daltons, participa en el acoplamiento de la subunidad 30 S con el ARN-m. (fig. 19-15). Los tres factores son igualmente esenciales en la síntesis cuando intervienen ARN-m naturales, pero no en el

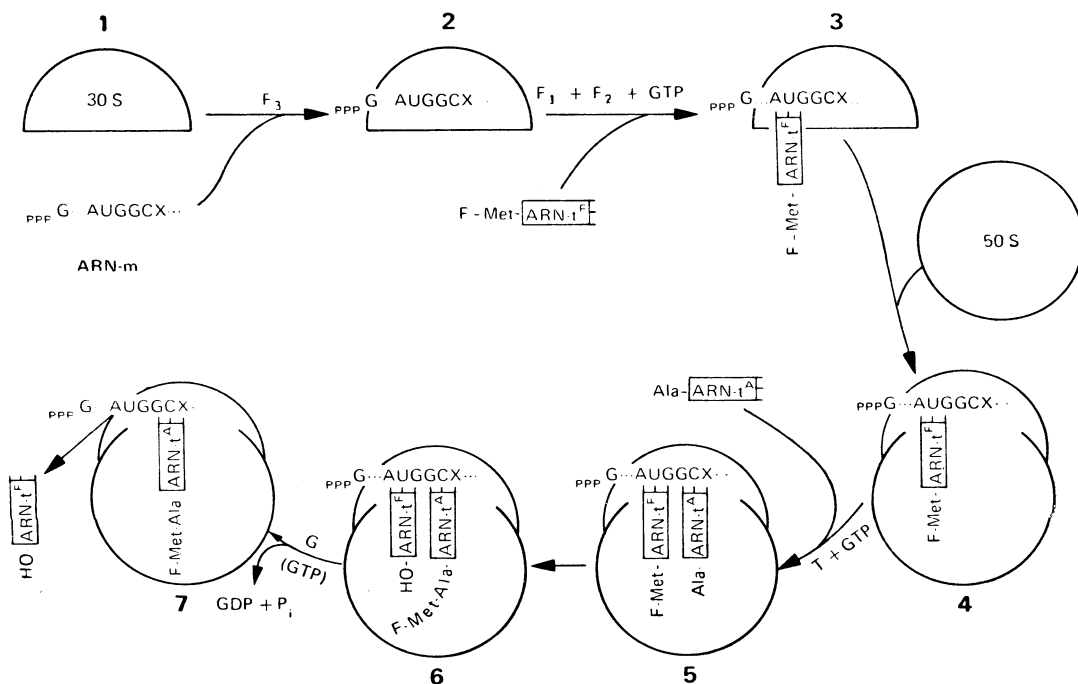


FIG. 19-15. Esquema del mecanismo de la síntesis proteica. 1-3 Formación del complejo de iniciación con la subunidad 30 S; 4, la asociación de la subunidad 50 S; 5, la unión del aminoacil-ARN-t al ribosoma; 6, la formación de la primera unión peptídica; 7, la salida del ARN-t deacilado. (Véase la descripción en el texto.)

caso de los ARN-m artificiales como el poli-U.³⁸ Es probable que el factor F_3 intervenga también en la disociación del ribosoma 70 S.

En la parte superior de la figura 19-15 se resumen los pasos por los que atraviesa la formación del *complejo de iniciación*. Éste implica la intervención de la subunidad 30 S, Mg^{++} , los factores de iniciación y GTP. La especificidad de la subunidad 30 S sugiere que esta partícula posee un *sitio de iniciación*

Se ha logrado producir un anticuerpo antitraslocasa que inhibe el alargamiento de la cadena peptídica (Leder y col., 1969).

El fenómeno de alargamiento de la cadena puede ser considerado como un tipo de reacción cíclica en la cual el $T + GTP$ estimula la unión del aminoacil-trasfer-ARN, y el $G + GTP$ promueve la traslocación del peptidil-trasfer-ARN recientemente formado.⁴⁵ Para profundizar este tema consúltese Lipmann (1969).

TABLA 19-3. Factores proteicos que intervienen en la síntesis de proteína
(Modificado de Lipmann, 1969.)

<i>Factor</i>	<i>Origen</i>	<i>Función</i>
F_3	30 S	Disociación de 70 S
		<i>Iniciación</i>
F_3	30 S	Unión del ARN-m al 30 S
$F_1 - F_2$	30 S	Unión de la F-met-t-ARN a la 30 S
		<i>Alargamiento</i>
T (GTP)	Sobrenadante	Unión del GIP al AA-ARN-t
Peptidiltrasferasa	50 S	Unión peptídica
G (GTP)	Sobrenadante	GTPasa. Traslocación del peptidil-ARN-t.
		<i>Terminación</i>
$R_1 - R_2$	Sobrenadante	Liberación del polipéptido del ARN-t

capaz de reconocer la conformación estructural de la F-met-t-ARN.³⁹ (fig. 19-16).

Alargamiento de la cadena proteica. Los otros dos factores solubles, denominados T y G, fueron aislados en el laboratorio de Lipmann,^{40, 43} donde se demostró su actividad en el alargamiento de la cadena polipeptídica. El *factor T*, junto con el GTP, actúa uniendo el aminoacil-trasfer-ARN al ribosoma (figura 19-15, 5). Inicialmente, el factor T se une al GTP⁴¹ y al aminoacil-trasfer-ARN para constituir un complejo⁴⁴ susceptible de reaccionar rápidamente con los ribosomas, utilizando poli-U como ARN-m. El factor T está formado por dos proteínas: Tu y TS.

El *factor G*, también denominado traslocasa, junto con el GTP es responsable de la traslocación del ARN-m (fig. 19-15, 6 y 7). Tiene un peso molecular de 80.000 y es necesario para desdoblar el GTP en contacto con el ribosoma, dando GDP y fosfato inorgánico. Esta hidrólisis (actividad GTPásica) sería imprescindible para la remoción del t-ARN deacilado del ribosoma y para el proceso de traslocación (fig. 19-15, 7).

Papel de la subunidad 50 S. En el capítulo anterior se expresó que la subunidad 50 S contiene la enzima peptidil-trasferasa o péptido-sintetasa, que participa en la formación de la unión peptídica.⁴⁶ Otra función de la subunidad 50 S es la de proveer dos sitios de unión para las moléculas correspondientes de t-ARN. Estos dos sitios deben encontrarse próximos entre sí a fin de permitir la formación de la unión peptídica.

La dinámica de la síntesis proteica comprende la entrada constante de aminoacil-trasfer-ARN-s por un lado del ribosoma y la salida de moléculas de ARN-t por el otro, después de haber liberado los aminoácidos (fig. 19-15, 5 y 7 y 19-16). La hipótesis de los dos sitios supone que uno de ellos acomoda al aminoacil-trasfer-ARN (sitio aminoacídico), mientras que el otro sostiene a t-ARN con la cadena peptídica en crecimiento (sitio peptídico).

El crecimiento por pasos de la cadena polipeptídica implica: a) la entrada del aminoacil-trasfer-ARN en el sitio aminoacídico; b) la formación de la unión peptídica con la consecuente exclusión del t-ARN que se encon-

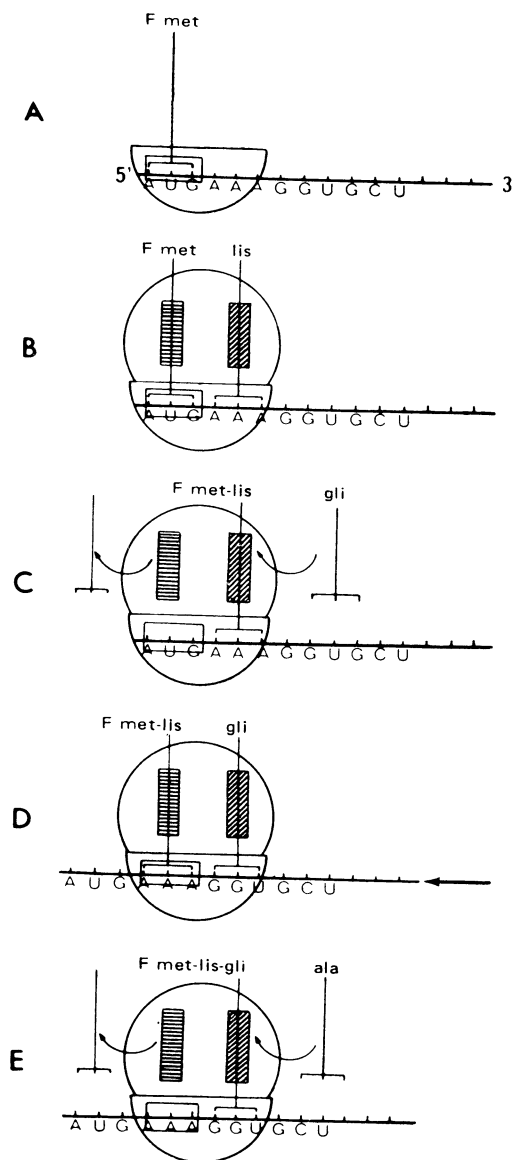


FIG. 19-16. Esquema que representa los estadios tempranos de la síntesis proteica sobre el ARN-m, en la dirección $5' \rightarrow 3'$. Con un rectángulo blanco se indica el sitio de iniciación en la 30 S. Los sitios aminoacílico o aceptor y peptídico o dador en la 50 S, están representados con bandas horizontales y oblicuas, respectivamente. A Complejo de iniciación en el cual la formilmetionina-ARN-t (F-met) se une al primer codón del ARN-m (AUG). B Se ha formado el ribosoma 70 S y el segundo aminoacil-ARN-t (Lis-ARN-t) se ha unido al segundo codón (AAA). C Se elimina el ARN-t del sitio peptídico y se forma la primera unión peptídica. D Se produce la traslación del ARN-m y del ARN-t-peptídico. Un nuevo aminoacil-ARN-t (gli-ARN-t) se une al tercer codón (GGU). E Se repiten los fenómenos moleculares del C. (De S. Ochoa, 1968, modificado.)

traba en el sitio peptídico, y c) el movimiento del t-ARN (ahora llevando la cadena peptídica) desde el sitio "aminoacídico" al "peptídico". El proceso anterior debe acoplarse con el movimiento simultáneo del ARN-m para colocar el codón siguiente en el lugar adecuado (fig. 19-16).⁴⁷ Esta traslación, en la cual el ribosoma se mueve a lo largo del ARN-m en la dirección $5' \rightarrow 3'$, requiere el factor G y el GTP, mientras que la energía necesaria es suministrada por la hidrólisis del GTP. La principal objeción que ofrece esta hipótesis es su dificultad para explicar el cambio de posición o traslación de los dos sitios de unión, que debe incluir algún tipo de contracción del ribosoma. Se han propuesto modelos para aclarar dicha traslación.^{48,49} A pesar de que son todavía muy especulativos, insisten sobre el hecho de que las dos subunidades ribosómicas desempeñan diferentes papeles en la síntesis proteica.

La velocidad de estos procesos coordinados es tal, que sólo requiere un minuto la elaboración de una cadena peptídica de la hemoglobina, que posee 150 aminoácidos. Cuando el polipéptido ha completado su crecimiento, el t-ARN terminal debe desprenderse, originándose entonces un grupo COOH terminal libre. Hasta que ello sucede, la cadena permanece adherida a la subunidad 50 S.

Terminación de la cadena. La terminación de la cadena polipeptídica ocurre cuando el ribosoma 70 S que trasporta al peptidil-transfer-ARN alcanza un codón de terminación. Estos codones se localizan presumiblemente al final de cada cistron. La terminación de la cadena produce la liberación del polipéptido libre y del t-ARN, así como la disociación del ribosoma 70 S en sus subunidades 30 y 50 S. Distintos estudios de síntesis proteica realizados con polinucleótidos sintéticos tienden a indicar que los codones UAA, UGA y UAG están implicados en la terminación de la cadena. (fig. 19-8). Parece ser necesaria, además, la presencia de un factor de naturaleza proteica en este último paso.^{50, 51} Hace poco se aislaron dos factores de liberación R_1 y R_2 .⁵² Ambos poseen un peso molecular de 45.000, siendo el R_1 específico para los codones UAG y UAA, y el R_2 , para el UAA y UGA. Más detalles sobre el tema se encontrarán en Ochoa (1968) y Lipmann (1969).

Papel de la subunidad 60 S en ribosomas adheridos al RE. En células secretoras, como las pancreáticas o los hepatocitos, la mayor

parte de los ribosomas se hallan adheridos a la membrana del RE y dicha asociación se conserva aun después que la fracción micro-sómica es aislada mediante centrifugación (fig. 10-10). La relación entre ribosomas y membranas parece tener significación fisiológica.

Se ha demostrado *in vivo* que los ribosomas adheridos son más eficientes en la síntesis proteica que los que están libres en la matriz citoplásmica.⁵³ La adherencia podría estar relacionada con el traslado de la proteína recientemente sintetizada hacia el interior de las cisternas del RE. El proceso ocurre entre la subunidad grande (60 S) del ribosoma y la membrana.^{22, 54} En buenas fotomicrografías electrónicas se observa una hendidura paralela a la membrana del RE que separa las dos subunidades ribosómicas (fig. 18-2). Se ha propuesto un modelo en el cual existe un espacio o canal central, dentro de la subunidad mayor del ribosoma, que se continúa con la cavidad de la cisterna (fig. 19-12). También se sostiene un flujo vectorial (es decir, unidireccional) del polipéptido recientemente formado dentro del espacio.⁵⁵ Este modelo podría vincularse con el hecho de que existe una porción de la cadena polipeptídica en crecimiento que no es digerida al ser tratada con enzimas proteolíticas. El fragmento proteolítico resistente del polipéptido comprende alrededor de 30 a 35 aminoácidos, con una longitud total de 100 Å.⁵⁶ El canal endorribosómico protegería esta porción de la molécula proteica de la acción de las enzimas proteolíticas (véanse cap. 18 y fig. 19-12).

Acción de los antibióticos sobre la síntesis proteica

Aun cuando el tema excede los objetivos de este libro, es importante tener una idea acerca del mecanismo de acción de los antibióticos en la síntesis proteica. Ello aclarará el estudio de este proceso.

Por ejemplo, la *tetraciclina* inhibe preferentemente la unión del aminoacil-trasfer-ARN al sitio "aminoácido" del ribosoma.

La *puomicina* ataca la unión aminoacil-trasfer-ARN en el sitio "peptídico". Esta última actúa sustituyendo el t-ARN y formando una cadena polipéptido-puomicina, que interrumpe la síntesis aun a 0°C. Ya hemos mencionado que la puomicina tiende también a disociar los polisomas, ocasionando la acumulación de subunidades ribosómicas.

Otro ejemplo interesante es el del *ácido fusídico* que bloquea la traslocación inducida por el factor G.

El *cloranfenicol* inhibe la síntesis proteica en las bacterias, cloroplastos y mitocondrias, pero no en el sistema ribosómico citoplásmico.

Por otro lado, la *cicloheximida* inhibe la síntesis citoplásmica.

La *estreptomicina* produce una lectura errónea del mensaje genético, interfiriendo a nivel de la interacción t-ARN-ribosoma (véase Kaji y col., 1969).

ULTRAESTRUCTURA DE LOS GENES

Desde los estudios de Mendel, la noción de "factor hereditario" o gene han experimentado un cambio considerable. Podemos decir que su definición encierra un concepto activo y asume significados diferentes de acuerdo con el punto de vista que se intenta destacar. En su sentido clásico, el gene constituye una *unidad de función* que ocupa un *locus* definido en el cromosoma y es responsable de una diferencia fenotípica específica; por ejemplo en la *Drosophila*, alas largas o vestigiales, ojos blancos o amarillos, etcétera. Al mismo tiempo, es una *unidad de transmisión* o *de segregación* puesto que puede segregarse e intercambiarse durante la meiosis por medio del *crossing-over*, y una *unidad de mutación*, porque mediante un cambio espontáneo o inducido puede dar lugar a una expresión fenotípica diferente (véase cap. 14).

Con el avance de nuestros conocimientos acerca de los mecanismos bioquímicos de los fenómenos genéticos se hizo evidente que estas definiciones del gene eran parciales y que se necesitaban correlaciones más precisas al nivel molecular. En su aspecto bioquímico, un gene estructural consiste en un determinado segmento de una molécula de ADN que contiene suficiente información como para codificar una molécula de ARN-m y para que ésta produzca, a su vez, una proteína (o enzima) particular. Esto incluye también el caso de los ARN mensajeros policistronicos o poligénicos.

La meta final de la Genética molecular sería la de precisar en la molécula de ADN la estructura de los genes como una secuencia determinada de nucleótidos. Un primer resultado se logró con el establecimiento del código genético y del cordón, subunidad genética susceptible de especificar un aminoácido dado. Sin embargo, la molécula proteica (véase cap. 4) posee una estructura muy compleja con una secuencia de aminoácidos (estructura primaria), una estructura secundaria, terciaria y aun cuaternaria, además de regiones especialmente diferenciadas para una actividad específica (por ejemplo, grupos activos de una enzima). Parece ser que la secuencia de aminoácidos condiciona las estructuras secundaria

terciaria y cuaternaria. En este campo queda todavía por esclarecer la correlación entre la estructura molecular de los genes y de las proteínas, pero con el empleo de microorganismos se están logrando actualmente progresos en ese sentido.

Recombinación en bacteriófagos

Los bacteriófagos (virus que infectan bacterias) se prestan mejor que otros organismos para el análisis de la ultraestructura de los genes (fig. 19-17). Actúan inyectando su molécula de ADN y se multiplican para producir en pocos minutos cientos de copias, finalmente terminan con la lisis de la bacteria. La figura 19-17 demuestra la compleja estructura molecular del bacteriófago T_4 e indica la función probable de sus diversas partes. El efecto de los fagos sobre las bacterias es fácilmente observado en cultivos en agar. Al cabo de pocos minutos cada partícula de fago ocasiona una región de lisis (denominada placa),

que puede presentar características especiales en diferentes mutantes. Algunos de ellos se reconocen por los tipos de bacterias que atacan, constituyendo la susceptibilidad bacteriana un método para identificarlas. Un fago es un organismo haploide que cuenta con un solo cromosoma. El ADN del fago T_4 posee alrededor de 200.000 pares de bases y contiene suficiente información genética como para codificar un número ilimitado de proteínas. Puesto que una bacteria puede infectarse simultáneamente con dos mutantes diferentes de un fago, es posible la recombinación entre ambas moléculas de ADN. Dichas recombinaciones son susceptibles de reconocerse aun cuando se encuentren en muy pequeñas proporciones (por ejemplo, uno en 10^8 ó 10^9).

Este tipo de análisis ha permitido trazar mapas genéticos que se aproximan al nivel molecular.⁵⁷ La mayor parte de las investigaciones se concentraron en una porción particular del genomio del fago T_4 , denominada *locus rII*, que representa un pequeño porcentaje de la molécula total de ADN (fig. 19-18).

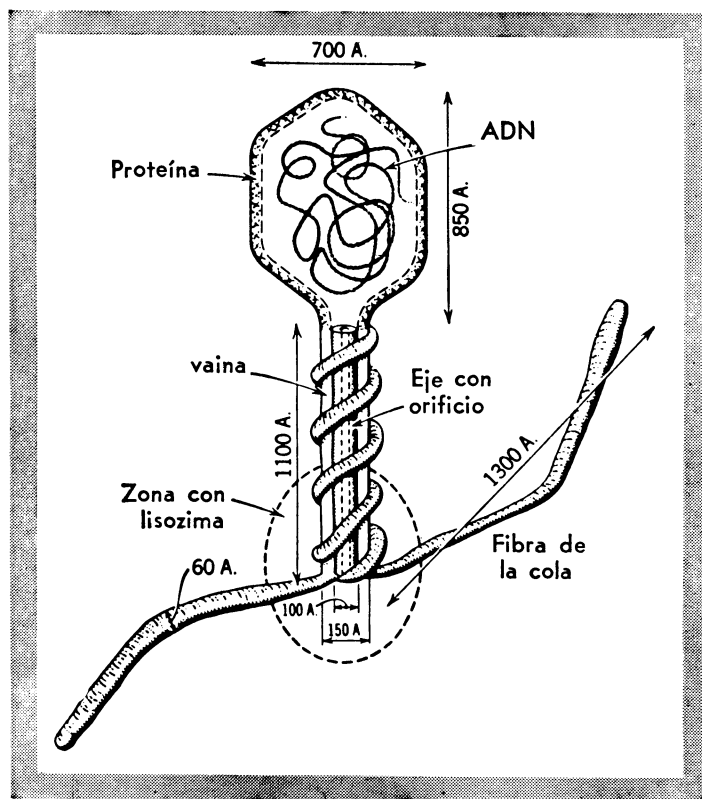


FIG. 19-17. Esquema de la organización macromolecular de un bacteriófago, en el que se indica la probable función de cada parte.

Los mutantes *rII* son fácilmente identificables porque: a) producen grandes placas irregulares en cepas B de *E. coli*, y b) no crecen en la cepa K_{12} de *E. coli* (la variedad silvestre de T_4 crece en ambas cepas). Si una cepa K_{12} es infectada simultáneamente con la variedad silvestre del fago T_4 y la mutante *rII*, se producen algunos recombinantes entre ellas como resultado del *crossing-over* de ambas moléculas de ADN, posibilitando así el análisis de las recombinaciones del locus *rII*. Una de las derivaciones de la aplicación del análisis genético a este locus fue la definición del *cistrón*, mediante la prueba de *complementación cis-trans*.^{57, 58}

El *cistrón* es considerado como una porción de la molécula de ADN que posee la información necesaria para codificar una única cadena polipeptídica simple (hemos usado indistintamente los términos *cistrón* y *gene*).

La figura 19-19 muestra las bases de la prueba de complementación *cis-trans*. Suponiendo que las mutaciones se produjeron en diferentes *cistrones* (*genes*), éstos deben encontrarse en posición *cis* o *trans*; en ambos casos, debido al efecto de los *cistrones* alelos, el resultado es un organismo funcionante. Si las dos mutaciones ocurren en el mismo *cistrón*, la situación variará según que su posición sea *cis* o *trans*: en el primer caso, existirá complementación y se originará un organismo funcionante; en el segundo, ello no sucederá y el organismo no podrá sobrevivir. Mediante esta prueba se ha observado que el locus *rII* del fago T_4 consta de dos *cistrones* (A y B) que se han subdividido en fragmentos más pequeños (figura 19-18). Este tipo de estudio llevó a Benzer a reconocer diferentes unidades genéticas. Por ejemplo: el *recón* es la unidad de recombinación, y su expresión mínima corresponde a la distancia entre dos nucleótidos; el *mutón* es la unidad de mutación y en su expresión mínima comprende un par de nucleótidos. Esto es fácilmente comprensible, ya que el cambio en una base del *codón* puede dar lugar a un aminoácido diferente.

REGULACIÓN DE LA ACCIÓN DEL GENE

Hasta ahora hemos desarrollado el concepto de "gene estructural", con el cual se designa a un segmento de la molécula de ADN, cuya información codificada puede ser traducida en la estructura específica de una molécula proteica. La imagen dada hasta este punto es la de un fenómeno unidireccional y muy estable controlado por el ADN y que se inicia con la síntesis de un ARN. Pasaremos a considerar el aspecto inverso, es decir, cómo se puede modificar la acción de los genes

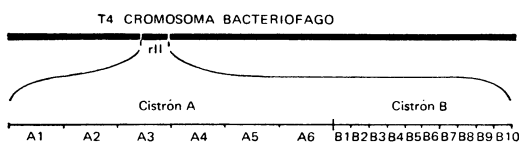


FIG. 19-18. Locus *rII*, del cromosoma del bacteriófago T_4 . (De J. Paul.)

estructurales por influencia de otras partes del genomio o de factores externos (ambientales) que actúan a través del citoplasma. Este nuevo campo es de gran importancia, puesto que comprende los diferentes mecanismos que regulan la acción del gene. La regulación es una propiedad fundamental de la materia viviente, relacionada con su adaptación a los cambios del medio y a los fenómenos de crecimiento y diferenciación. Aquí citaremos brevemente algunos de los mecanismos por los cuales la acción del gene es regulada en organismos inferiores. La regulación en células de eucariontes será tratada junto con la diferenciación celular en el capítulo siguiente.

Inducción y represión enzimáticas

Ya en 1900 se había descubierto que ciertos microorganismos podían cambiar su maquinaria enzimática por la influencia de sustratos específicos (sustancias alimenticias agregadas al medio). Este fenómeno, designado *adaptación* o *inducción enzimática*, es una verdadera modificación celular y no el resultado de un cambio en la población por división de determinadas células. La adaptación puede ser reversible, puesto que, en ausencia del inductor, el contenido enzimático puede decrecer (*desadaptación*). Empleando aminoácidos radiactivos se ha probado que la adaptación enzimática implica la síntesis de una nueva proteína.

Uno de los sistemas mejor conocidos es el de la β -galactosidasa de la *E. coli*, enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa.⁵⁹ Se ha demostrado que el inductor de la enzima y el sustrato sobre el que ella actúa pueden ser idénticos o diferir entre sí. En realidad, no todos los inductores son sustratos y no todos los sustratos son inductores. Por ejemplo, la metil- β -D-tio-galactosa es un inductor pero no un sustrato, y la fenil- β -D-galactosa es un sustrato pero no un inductor. Aisladas, estas sustancias no promueven el crecimiento, pero colocadas juntas éste se produce. Debido a esos

Disposición	Resultado	Conclusión
CISTRÓN 1 CISTRÓN 2		
Cis	Funcionante (un genomio completo)	Mutaciones en <i>cistrones</i> distintos
Trans	Funcionante (un genomio completo por complementación)	
Cis	Funcionante (un genomio completo)	Mutaciones en el mismo <i>cistrón</i>
Trans	No funcionante (no hay complementación)	

FIG. 19-19. Esquema que ilustra la prueba de la complementación *cis-trans*. (De J. Paul.)

hallazgos se ha sustituido el concepto de adaptación enzimática por el de *síntesis enzimática inducida*.

El fenómeno opuesto se denomina *represión enzimática*. En *E. coli* pudo determinarse que, por ejemplo, la síntesis de la enzima triptófano-sintetasa es inhibida selectivamente por el triptófano y otros compuestos semejantes. La represión enzimática, lo mismo que la inducción, implicaría no sólo una enzima, sino una serie completa de ellas, que actuarían en etapas metabólicas sucesivas.

La importancia de este fenómeno en la regulación de la célula es evidente. En todos los casos estudiados, el producto final de la secuencia biosintética inhibe la síntesis de la enzima correspondiente.

Genes reguladores

Las comprobaciones efectuadas en genética bacteriana tienden a demostrar que no todos los genes actúan determinando la estructura de una enzima dada; algunos son susceptibles de regular la acción de otros genes. El término *genes reguladores* que a ellos se aplica, denota una actividad diferente de la de los genes estructurales.

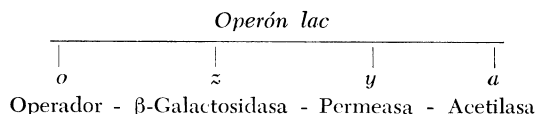
La mutación en el gene regulador no causa la desaparición o la alteración de una enzima definida pero puede producir un cambio muy acentuado en su actividad o condición de síntesis. Por ejemplo, el contenido de triptófano-sintetasa y de β -galactosidasa en *E. coli* puede ser alterado por genes reguladores especiales. Estos intervenirían en el efecto del medio sobre la inducción y la represión. Se ha sostenido que el gene regulador actúa por medio del *represor*, el cual ejerce su acción sobre una parte especial del genoma designado *gene operador*.

Genes operadores. Operón

Mientras que los genes reguladores no necesitan estar cerca de los genes estructurales sobre los cuales actúan, otra variedad de ellos

regula al gene estructural directamente a nivel del genoma. Son los llamados genes operadores, que para ejercer su efecto requieren una íntima unión y una configuración *cis* con los genes estructurales.

Uno de los mejores ejemplos de operón es el *operón lac*. Comprende una serie de genes estrictamente unidos en el cromosoma de *E. coli* y mediante un ARN-m multicistónico es capaz de producir los componentes que controlan la utilización de la lactosa.



Estos tres genes (*z*, *y*, *a*) están regulados por el mismo gene operador (*o*). La permeasa no es una enzima, sino un tipo de proteína transportadora necesaria para la entrada de este metabolito a la célula (la galactósido-trasacetilasa cataliza la transferencia de un grupo acetilo de la acetil-coenzima A a la galactosa). Para Jacob y Monod,⁶⁰ el objetivo del represor es el operador presente en un extremo del operón lac. Se supone que el operador puede existir en dos estadios, abierto o cerrado. Está abierto en el momento en que se encuentra libre del represor, pudiendo entonces inducir a los genes lac a entrar en acción, produciéndose ARN-m. En su condición cerrada, el represor se une al operador e impide la transcripción del ARN-m para todos los genes del operón y, por ende, la producción de las correspondientes proteínas enzimáticas (véase Beckwith, 1967).

Otra característica importante es que el operador controla diversos genes estructurales relacionados. Por ejemplo, todos los genes comprometidos en la biosíntesis de histidina están controlados por un solo operador.⁶⁰ Jacob y Monod crearon una nueva unidad ge-

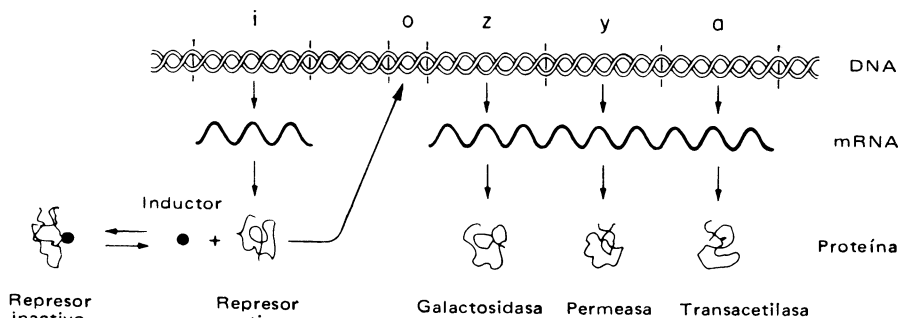


FIG. 19-20. Modelo de Jacob y Monod de la regulación, aplicado al operón lac de *Escherichia coli*. (Cortesía de G. S. Stent.)

nética, el *operón*, que incluye al operador y a un conjunto de genes que están bajo su control. El operón es mayor que el gene y que el cistrón porque comprende al operador y varios genes más. Ambos genes, el regulador y el operador, son transportados en los cromosomas, pueden recombinarse y están constituidos por ADN.

Regulación del gene a nivel de la transcripción

Los conceptos mencionados implican la existencia de mecanismos sutiles de regulación genética que operan a nivel de la transcripción, es decir, de la codificación del ARN-m. Retomando el problema de la inducción enzimática, podemos preguntarnos cómo puede actuar un metabolito en este mecanismo de regulación genética. La hipótesis más plausible es la que se indica en la figura 19-20. El inductor, combinándose con el represor, lo transforma en una molécula inactiva, incapaz de ligarse con el operador. Cuando el operador se libera (en el estadio abierto) es susceptible de inducir la activación de los genes (*z*, *y*, *a*) y elaborar más ARN-m. Que la regulación del gene es llevada a cabo a nivel de la transcripción, ha sido comprobado mediante experimentos de hibridación. En ellos las bacterias inducidas contenían una cantidad mucho mayor de ARN-m capaz de formar híbridos con esta región del operón *lac*.^{61, 62}

El mismo modelo de la figura 19-20 explica también los casos de represión enzimática como el mencionado de la triptófano-sintetasa, que se inhibe por el triptófano, o el de la cadena sintética de la histidina, que puede ser inhibida por la histidina. Se presume, en uno y otro ejemplo, que la afinidad espontánea operador-represor, es normalmente baja y que aumenta con la influencia del metabolito (actualmente denominado *co-represor*). En otras palabras, la unión del metabolito con el represor activa a este último, cerrando el operador (véase Stent, 1967).

Naturaleza del represor. El represor es una proteína que puede ser aislada e identificada por su unión con inductores radiactivos. El represor *lac* fue estudiado en una mutante de *E. coli* que posee una notable afinidad por el inductor radiactivo isopropil-galactósido (IPTG).⁶³ La proteína que liga el IPTG tiene un peso molecular de 200.000 Daltons. Usando represor *lac* radiactivo aislado se demostró su unión con el ADN contenido en el operador *lac*. El reconocimiento del operador por el represor es aparentemente un mecanismo directo, en el que no media el ARN.⁶⁴ Conclusiones similares se obtuvieron con respecto al represor del fago *lambda*.⁶⁵ (véase Bretscher, 1968).

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Algranati, I. D., González, N. S. and Bade, E. G.: (1969) Physiological role of 10S ribosomes in bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 62:574.
- Anfinsen, C. B.: (1961) *The molecular basis of evolution*. John Wiley & Sons, New York.
- Basilio, Carlos: (1967) RNA Code Words in Several Species. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 27:181.
- Beckwith, Y. R.: (1967) Regulation of the Lac Operon. *Science*, 156:597.

- Bonner, D. M.: (1961) *Heredity*. Prantice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Bretscher, M. S.: (1968) How repressor molecules function. *Nature*, 217:509.
- Brian, F. C., Kzeld, A. and Marcker: (1968) How proteins start. The chemical signal that initiates a chain of amino acid units has been detected. *Scient. Amer.*, 218:36.
- Crick, F. H. C.: (1966) The genetic code: yesterday, today and tomorrow. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 31:3.
- Crick, F. H. C.: (1967) Origin of the genetic code. *Nature*, 233:5072, 119.
- Du Praw, E. J.: (1968) *Cell and molecular biology*. Academic Press, New York.
- Gardner, L. I. (ed.): (1961) *Molecular genetics and human disease*. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
- Goulian, M.: (1969) Synthesis of viral DNA. *Scient. Amer.*, March, p. 35.
- Kaempfer, R.: (1969) Ribosomal subunit exchange of an eucaryote. *Nature*, 22:950.
- Leder, P., Skogerson, L. E. and Roufa, D. J.: (1969) Properties of an antitranslocase antibody. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 62:928.
- Ochoa, S.: (1963) Synthetic polynucleotides and the genetic code. *Fed. Proc.*, 22:62.
- Ochoa, S.: (1967) The molecular basis of translation of the genetic message. *Ninth Int. Cancer Congress*, 9. Springer Verlag, p. 86.
- Ochoa, S.: (1968) Translation of the Genetic Message. *Naturwissenschaften*, 55:505.
- Philipps, B. R.: (1969) Primary structure of transfer RNA. *Nature*, 223:374.
- Proteins at Cold Spring Harbor: (1969) *Nature*, 223:133.
- Roberts, J. A. F.: (1963) *An introduction to medical genetics*, 3rd ed.
- Sager, R. and Ryan, F. J.: (1963) *Cell heredity*, John Wiley & Sons, N. Y.
- Smith, A. E. and Marcker, K. A.: (1968) *J. molec. Biol.*, 38:241.
- Spiegelman, S.: (1963) Genetic mechanism. Information transfer from the genome. *Fed. Proc.*, 22:36.
- Subramanian, A. R., Ron, E. Z. and Davies, B. D.: (1968) A factor required for ribosome dissociation. In: *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 61:761.
- Watson, J. D.: (1965) *Molecular Biology of the gene*. W. A. Benjamin Inc., New York.
- Yanofsky, Ch.: (1967) *Gene structure and protein structure*. *Scient. Amer.*, 216:80.
- Zubay, G.: (1963) Molecular model for protein synthesis. *Science*, 140:1092, 3571.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Pauling, L.: (1952) *Proc. amer. Phil. Soc.*, 96:556.
2. Ingram, V. M.: (1966) *The biosynthesis of macromolecules*. V. A. Benjamin, Inc. New York.
3. Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Risebrough, R. W. and Watson, J. D.: (1961) *Nature*, 190:581.
4. Spirin, A. S., Beltisina, N. V. and Lerman, M. I.: (1965) *J. molec. Biol.*, 14:611.
5. Perry, R. P. and Kelley, D. E.: (1968) *J. molec. Biol.*, 35:37.

6. Henshaw, E. C.: (1968) *J. molec. Biol.*, 36:401.
7. Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G., Madison, J., Marquisee, M., Merrill, S., Penswick, J. and Zamir, A.: (1965) *Science*, 147:1462.
8. Madison, J., Everett, G. and Kung, H.: (1967) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 31:409.
9. Zachau, H. G., Dutting, H., Feldmann, E., Melchers, F. and Karau, W.: (1967) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 31:417.
10. Dube, S. K., Marcker, K. A., Clark, B. F. C. and Cory, S.: (1968) *Nature*, 218:232.
11. Nirenberg, M. and Matthali, J.: (1951) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 47:1588.
12. Grunberg-Manago, M., Ortiz, M. P. J. and Ochoa, S.: (1956) *Biochim. biophys. Acta*, 20:269.
13. Ochoa, S.: (1963) *Fed. Proc.*, 22:62.
14. Nirenberg, M. and Ochoa, S.: (1963) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 28:549 and 559.
15. Nirenberg, M.: (1967) *The Neurosciences*, p. 143. The Rockefeller Press, New York.
16. Khorana, H. G.: (1965) *Fed. Proc.*, 24:1473.
17. Nishimura, S., Jones, D., Ohtsuka, E., Hayatsu, H., Jacob, T. and Khorana, H.: (1965) *J. molec. Biol.*, 13:283.
18. Brenner, S., Stretton, A. O. W. and Kaplan, S.: (1965) *Nature*, 206:994.
19. Warner, J. R., Rich, A. and Hall, C. E.: (1962) *Science*, 138:1399.
20. Wettstein, F. O., Staebelin, T. and Noll, H.: (1963) *Nature*, 197:430.
21. Rich, A.: (1967) *The Neurosciences*, p. 101. (G. C. Quarton, Melnechuk, T. and Schmitt, F. O., eds.) The Rockefeller University Press.
22. Shelton, E. and Kuff, E. L.: (1966) *J. molec. Biol.*, 22:23.
23. Weiss, P. and Grover, N. B.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:763.
24. Mangiarotti, G. and Schlessinger, D.: (1966) *J. molec. Biol.*, 20:123.
25. Kaempfer, R.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 61:106.
26. Kaempfer, R., Meselson, M. and Raskas, H. J.: (1968) *J. molec. Biol.*, 31:277.
27. Colombo, B., Vesco, C. and Baglioni, C.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 61:651.
28. Nomura, M. and Lowry, C. V.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:946.
29. Marcker, K. and Sanger, F.: (1964) *J. molec. Biol.*, 8:835.
30. *Nature*, 219:828 (1968).
31. Clark, B. F. C. and Marcker, K.: (1968) *Scient. Amer.*, p. 36. January.
32. Stanley, W. M., Salas, M., Wahba, A. J. and Ochoa, S.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:290.
33. Thach, R. E., Dewey, K. F., Brown, J. C. and Doty, P.: (1966) *Science*, 153:416.
34. Brawermann, G. and Eisenstadt, J.: (1966) *Biochemistry*, 5:2784.
35. Revel, M. and Gros, F.: (1966) *Biochem. biophys. Res. Comm.*, 25:124.
36. Iwasaki, K., Sabol, S., Wahba, A. J. and Ochoa, S.: (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 125:542.
37. Revel, M., Herzberg, M., Becarevic, A. and Gros, F.: (1968) *J. molec. Biol.*, 33:231.
38. Wahba, A. J., Mazumder, R., Iwasaki, K., Chae, Y. B., Miller, M. J., Sillero, M. A. G. and Ochoa, S.: (1969) *Fed. Europ. Biochem. Soc. VI Meeting*, Madrid, p. 9.
39. Ochoa, S.: (1968) *Naturwissenschaften*, 11:505.
40. Nishizuka, Y. and Lipman, F.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55:212.
41. Allende, J. E., Seeds, N. W., Conway, T. W. and Weissbach, H.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1566.
42. Ertel, R., Brot, N., Redfield, B., Allende, J. E. and Weissbach, H.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:861.
43. Lucas-Lennard, J. and Haenni, A. L.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:554.
44. Gordon, J.: (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 59:179.
45. Haenni, A. L.: (1969) *Fed. Europ. Biochem. Soc. VI Meeting*, Madrid, p. 9.
46. Monro, R. E.: (1967) *J. molec. Biol.*, 26:147.
47. Watson, J. D.: (1965) *Molecular biology of the gene*. W. A. Benjamin Inc., New York.
48. Spirin, A.: (1968) *Bocklady An URRS*, 179s 1467.
49. Bretcher, M. S.: (1968) *Nature*, 218:675.
50. Capecchi, M. R.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55:1517.
51. Capecchi, M. R.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:1144.
52. Siekevitz, P. and Palade, G.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:619.
53. Halliman, H., Murty, C. N. and Grant, J. H.: (1968) *Life Sci.*, 7:225.
54. Sabatini, D. D.: (1966) *J. molec. Biol.*, 19:503.
55. Redman, C. M. and Sabatini, D. D.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:608.
56. Malkin, L. J. and Rich, A.: (1968) *J. molec. Biol.*, 26:329.
57. Benzer, S.: (1962) The fine structure of the gene. *Scient. Amer.*, 206:70.
58. Paul, J.: (1967) *Cell Biology*. Heinemann Educational Books, Ltd., London.
59. Monod, J.: (1956) In: *Enzymes: Units of biological structure and function*, p. 728. (Gaebler, O. H., ed.) Academic, Press, New York.
60. Jacob, F. and Monod, J.: (1961) *J. molec. Biol.*, 3:318.
61. Attardi, G., Naono, S., Rouviere, J., Jacob, F. and Gros, E.: (1963) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 28:363.
62. Hayashi, M., Spiegelman, S., Franklin, W. C. and Luria, S. E.: (1963) *Proc. Nat. Sci. (Wash.)*, 49:129.
63. Gilbert, W. and Muller-Hill, B.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:189.
64. Gilbert, W. and Muller-Hill, B.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58:2415.
65. Ptashne, M.: (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 57:306.

Diferenciación celular e interacción celular

Uno de los aspectos más importantes de la Biología moderna es interpretar los organismos y células superiores a la luz de los fenómenos moleculares que tienen lugar en los virus y bacterias. Estos ofrecen la ventaja de poseer una organización estructural más simple y de haber sido estudiados por métodos bioquímicos y genéticos en condiciones mucho más precisas y reproducibles. Como se manifestó en el capítulo precedente, las investigaciones pusieron en claro los mecanismos fundamentales por los cuales los genes se duplican y la expresión genética es regulada. Esos procesos se cumplen de un modo general en las células superiores y ya hemos mencionado que existe un mismo código genético para todos los organismos.

La mayor complejidad de la célula vegetal o animal con respecto a una bacteria implica la posesión por parte de las primeras de cantidades mucho más elevadas de información genética. Sabemos que el ácido desoxirribonucleico (ADN) de la *Escherichia coli* tiene una longitud de 1 mm y cerca de $4,5 \times 10^6$ nucleótidos.¹ En cambio el ADN del espermatozoide del toro (haploide) contiene $3,2 \times 10^9$ nucleótidos, lo cual equivale a alrededor de setecientas veces más información genética. Esta diferencia cuantitativa debería reflejarse, a nivel de la transcripción genética, por el mayor número de proteínas estructurales y enzimas. Sin embargo, veremos posteriormente que el aumento de tamaño del genoma no es, en realidad tan acentuado como lo indica el contenido de ADN de ciertas células. Por ejemplo, en el *Amphiuma*, el organismo viviente conocido que posee el genoma más grande (168 pg de ADN y cerca de 8×10^{10} nucleótidos), se ha comprobado que el 80 por ciento de éste se halla constituido por ADN repetido o redundante. En otros párrafos ana-

lizaremos con más detención este tema junto con el de la amplificación del gene en las células superiores.

En ellas, la regulación de la función genética debe ser también mucho más complicada que la de las bacterias. Sólo el equilibrio exacto de los genes puede producir el desarrollo normal de un organismo complejo. Ya hemos visto que el aumento de un solo cromosoma (dando como resultado una trisomía) es susceptible de manifestarse por un desarrollo anormal, que conduce a alteraciones graves del sistema nervioso (mongolismo). En el nivel cromosómico, la regulación genética se puede relacionar con la existencia de proteínas fuertemente unidas al ADN (histonas y algunas proteínas ácidas), que faltan en el ADN bacteriano. Asimismo, las proteínas pueden pasar del citoplasma al núcleo y viceversa, e influir sobre la expresión genética (véase cap. 17).

DIFERENCIACIÓN CELULAR

En los organismos multicelulares ciertas células se adaptan a funciones específicas y, por ende, experimentan modificaciones morfológicas. Por ejemplo, las células nerviosas adoptan una forma y una estructura acordes con las funciones de *irritabilidad* y *conductividad*, las cuales les permiten reaccionar a estímulos y transmitir señales de una parte del organismo a otra. Esta especialización progresiva en estructura y función constituye, en un sentido restringido, la *diferenciación celular*.

La diferenciación celular se produce continuamente a lo largo de la vida de un organismo, si bien alcanza su máxima expresión en el período embrionario. La mayoría de los organismos se desarrollan a partir de una sola célula —el óvulo *fecundado*— que da lugar

a todos los tejidos y órganos. Esa célula se divide activamente para formar la estructura embrionaria conocida como *blástula*, en la cual los tejidos todavía no están definidos. En muchas especies el proceso es fundamentalmente cuantitativo (aumento del número de células), pero después del período de blástula se hace también cualitativo. Las células de la blástula comienzan a reordenarse durante la *gastrulación*, etapa embrionaria en la que se constituyen las tres hojas germinativas y los futuros órganos se van determinando. A partir de este período ocurre la *diferenciación celular*, con la formación de los diversos tejidos (*histogénesis*) y órganos (*organogénesis*).

Sólo en años recientes el campo de la Biología del desarrollo (que incluye la diferenciación celular como uno de sus principales capítulos) ha abandonado su enfoque puramente morfológico, alcanzando los niveles celular y molecular. En este aspecto es importante establecer que la diferenciación celular se produce por lo común sin un cambio cuantitativo del genomio. El hecho de que todas las células diploides de un organismo tengan al mismo contenido de ADN (véase cap. 17), sugiere que la diferenciación celular no depende de una ganancia o pérdida de información genética, sino de otros factores que actúan probablemente sobre los procesos de transcripción y traducción.

En términos moleculares, la diferenciación celular implica la síntesis preferente de algunas proteínas específicas, como la hemoglobina en los eritrocitos, la gamma-globulina en los plasmocitos, la actina y la miosina en las células musculares, etcétera. Para inducir esa síntesis ciertos genes deberían trabajar en un momento preciso de la vida de determinados tipos celulares. La diferenciación celular se podrá explicar en términos moleculares, únicamente cuando sea comprendido el complejo mecanismo de la regulación genética que tiene lugar en las células superiores. Éste es todavía un objetivo por alcanzar.

Control nuclear del citoplasma

En los capítulos precedentes se hizo referencia a las interrelaciones nucleocitoplásmicas, ilustrándolas con diversos ejemplos. El núcleo y el citoplasma son interdependientes: uno no puede sobrevivir sin el otro. Mientras que el citoplasma provee la mayor parte de la energía de la célula por medio

de la fosforilación oxidativa (mitocondria) y de la glucólisis anaerobia, y posee además la "maquinaria" para la síntesis proteica (ribosomas), el núcleo aporta los moldes para la síntesis específica (ácido ribonucleico mensajero: ARN-m) y también otras importantes moléculas de ARN (ARN-r y ARN-t). En el estudio de las interrelaciones nucleocitoplásmicas deben considerarse: a) los mecanismos por los cuales los genes contenidos en el cromosoma ejercen su control sobre los procesos metabólicos del citoplasma, y b) los mecanismos por los cuales el citoplasma influye sobre la actividad genética.

Este problema fue considerado en el siglo pasado por Balbiani en los experimentos de *merotomía* (del griego: *meros*, parte), en los cuales los protozoarios eran despojados del núcleo. Esos fragmentos carentes de núcleo pueden cumplir la mayor parte de las actividades celulares: reaccionar a estímulos e ingerir alimentos (amebas); formar una membrana celulósica y llevar a cabo la fotosíntesis (células vegetales); mover las cilias (células ciliadas); tener un flujo citoplásmico, etcétera. Sin embargo, suelen sobrevivir sólo por un período corto y son incapaces de crecer y reproducirse. Entre 5 y 10 minutos después de ser enucleada por micromanipulación, una ameba pierde su tensión superficial, se hace esférica y los seudópodos disminuyen; su movimiento se ven reducidos y no puede ya digerir alimentos. En esas condiciones sobrevive alrededor de 20 días. Si en el lapso de 3 días se le reimplanta un núcleo, la ameba se extiende de nuevo y comienza a moverse de manera normal y a digerir alimentos; incluso puede dividirse y, eventualmente, desarrollar un cultivo celular.² Esta reactivación que ocasiona el núcleo implantado puede acontecer en pocos segundos o minutos. Cuando se trasfiere un núcleo de una ameba a otra de la misma especie (homotrasferencia), se asiste rápidamente a la actividad del citoplasma y la división. En cambio cuando el implante se realiza colocando el núcleo en células de otra especie (heterotrasferencia) el citoplasma es activado, pero la división se produce con menor frecuencia.³ Se han estudiado fragmentos celulares humanos anucleados en cultivo de tejidos.⁴

Control nuclear de la diferenciación en *Acetabularia*

El alga unicelular marina *Acetabularia* es un sistema excepcional para el estudio de las relaciones nucleocitoplásmicas. El núcleo único de esta célula

gigante, que llega a medir hasta 6 cm, está ubicado en el extremo basal (rizoide) y puede ser fácilmente amputado. En este caso, la supervivencia suele prolongarse por meses. Durante parte de ese tiempo, la célula anucleada lleva a cabo actividades sintéticas y morfogenéticas, lo cual indica cierta autonomía del citoplasma o la acumulación en él de productos nucleares. La síntesis proteica en células anucleadas es esencialmente normal en la primera semana. En cambio, la fotosíntesis y la respiración sólo se ven afectadas al cabo de varios meses.

La síntesis de enzimas (fosforilasa, fosfatasa) está sujeta a ciclos individuales, lo cual indica que los productos nucleares pueden ser específicos para cada proteína. Se deduce, por tanto, que en el citoplasma existen cantidades variables de ARN-m diferentes, que provienen del núcleo.^{5, 6}

La *Acetabularia* constituye también un material excelente para el estudio de los problemas relacionados con la diferenciación celular. El extremo libre de esta alga marina posee una estructura en forma de sombrero, característica de la especie. Su morfología se halla determinada por el núcleo y ello puede demostrarse mediante el trasplante de éste. Por ejemplo, en *A. mediterránea* y en *A. crenulata* las estructuras antedichas son muy diferentes (fig. 20-1). Si se implanta un núcleo de *A. mediterránea* en una célula anucleada de *A. crenulata*, durante el segundo ciclo aparece un tipo de sombrero intermedio, y en el tercer ciclo el sombrero será totalmente del tipo del *A. mediterránea*. Este experimento, y el recíproco realizado mediante el trasplante nuclear de *A. crenulata* en *A. mediterránea*, demuestran que alguna sustancia difusible se ha producido en el núcleo y que, ésta después de algún tiempo, ejerce su efecto morfogénico en el extremo libre del alga. Si se injertan dos células nucleadas de diferentes especies, se obtiene un híbrido provisto de un sombrero de forma intermedia (fig. 20-1). Aun cuando la naturaleza de la sustancia que induce la diferenciación del sombrero es desconocida, podría tratarse de un ARN mensajero estable, que tiene a su cargo el control de la producción de proteínas específicas.^{6, 7} Cuando se administra ribonucleasa a estas algas, su porción anucleada es incapaz de regenerar el sombrero.

Control de la actividad nuclear en las primeras etapas del desarrollo

En el esquema de la figura 20-2 se indica de modo muy simplificado algunos de los principales fenómenos moleculares que ocurren en un huevo de anfibio antes y después de la fecundación.⁸ Durante la ovogénesis, la síntesis de las distintas especies de ARN y de proteínas es muy alta, pero cuando el huevo alcanza la maduración ésta se vuelve prácticamente nula. Al poco tiempo de la fecundación se comprueba que la síntesis de ADN aumenta en forma notable. Ello es aún más evidente puesto que, hasta entonces, tanto el espermatozoide como el núcleo son inactivos desde el punto de vista sintético; inactividad que abarca varias semanas (espermatozoide) o varios meses o años (ovocitos). Luego, en

el período de segmentación comienza la producción del ARN de transferencia (ARN-t) y de los ARN nucleares heterogéneos (que incluyen los ARN-m). Mientras que hasta entonces los ribosomas maternos fueron usados para la síntesis proteica, durante la gastrulación se dispone de una nueva dotación de ribosomas (fig. 20-2). La inducción de la síntesis de ADN se atribuye a la entrada de una proteína citoplásmica, probablemente ADN-polimerasa, en los pronúcleos del huevo.⁸ La enzima no se halla (o es inactiva) en el citoplasma del ovocito antes de la ruptura de la vesícula germinal, y aparece a poco de producirse ésta, encontrándose entonces el huevo en condiciones de ser fecundado.

Control citoplásmico de la síntesis de ADN

Los hallazgos precedentes y diversos experimentos de trasplante nuclear realizados con núcleos aislados en huevos de anfibios, indican que la función nuclear puede ser regulada por el citoplasma. Núcleos de blástulas, gástrulas, mórulas, y aun de epitelio intestinal y de cerebro experimentan cambios considerables al ser implantados en el cito-

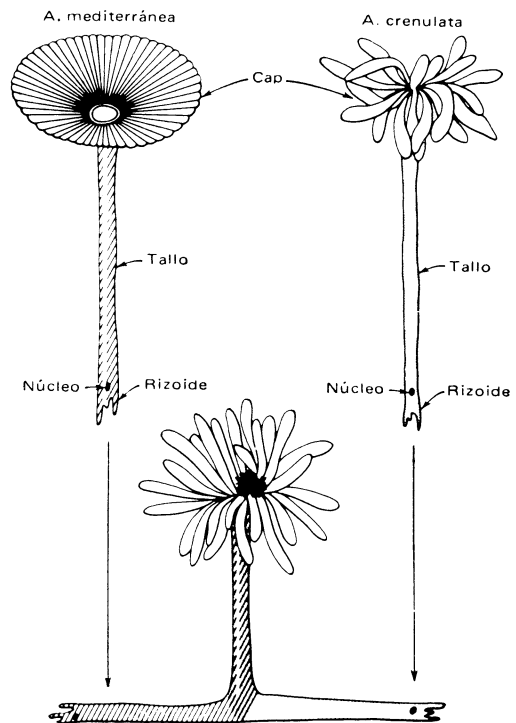


FIG. 20-1. Experimento de injerto nuclear entre dos especies de la alga unicelular *Acetabularia*. (De J. Hammerling.)

plasma del huevo. Lo primero que se comprueba es una hinchazón notable y la entrada de proteínas plasmáticas, lo cual es seguido de una intensa síntesis de ARN y de la duplicación del ADN.⁹ Los núcleos de células cerebrales, que normalmente no se dividen, son capaces de hacerlo al ser implantados en el huevo; y con núcleos del intestino pudo obtenerse el desarrollo de renacuajos completamente normales.^{10, 11}

Estos últimos experimentos contradicen, de alguna manera, los clásicos de King y Briggs,^{12, 13} quienes habían observado que cuando los núcleos eran extraídos después de la gastrulación se obtenían en general formas abortivas de desarrollo; ello indicaba que la aptitud del núcleo se hallaba restringida en este período.

Otra observación interesante es la producción de heteronúcleos por introducción de núcleos maduros de eritrocitos de pollo en células HeLa.¹⁴ En este caso, lo más saliente es también el aumento de tamaño del núcleo trasplantado, que se acompaña de una pérdida de la condensación cromatinica. El núcleo, carente de su capacidad de sintetizar ARN y ADN, puede reasumir ambas funciones por la influencia del citoplasma de la célula HeLa.

Acción del citoplasma durante la mitosis

Mecanismos similares actúan durante el ciclo mitótico normal. En la metafase, junto con la alta condensación del cromosoma, hay pérdida de la ADN-polimerasa¹⁵ y de proteínas no-histónicas.¹⁶ En el curso de la telofase, la ADN-polimerasa y otras moléculas presentes en el citoplasma son susceptibles de asociarse con las fibras de cromatina expandida. La mezcla de los cromosomas y del citoplasma durante la mitosis podría conducir a "reprogramar" la futura actividad genética celular.⁸

ADN redundante o repetido y amplificación genética

En el capítulo 18, al tratar de la biogénesis de los ribosomas, se expusieron los conceptos de redundancia del ADN y de amplificación del gene, y en la tabla 18-3 se mencionó el número de cistrones de ADN que intervienen en la síntesis del ARN ribosómico (ARN-r). Se indicó también que en algunos ovocitos de anfibio existen miles de genes similares, capaces de amplificar considerablemente la codificación del ARN-r.

Por medio de experimentos de hibridización se pudo estudiar en células de levadura el ADN redundante relacionado con la producción del ARN-t.¹⁷ Aquél se encuentra disperso entre los distintos cromosomas, distinguiéndose en ello del ADN ribosómico, que se localiza en el organizador nucleolar (véase cap. 18). Las moléculas de ADN presentes en las mitocondrias, cloroplastos y probablemente en otros componentes citoplásmicos (ADN citoplásmico) pueden considerarse asimismo repetitivas puesto que son muy similares en esos tipos de organoides. Como se verá más adelante, todas estas variedades de ADN redundante representan sólo una pequeña porción del total (quizá menos del 1 por ciento del genomio).

Se sabe actualmente que la redundancia de genes es una característica constante de todas las células eucariontes, desde los protozoarios hasta las células superiores de animales y vegetales. Esta es otra importante diferencia con respecto a los virus y bacterias (procariontes), en los que hay pocas secuencias del ADN repetidas dentro del genomio. Por ejemplo, en *B. subtilis* se hallan de 3 a 4 genes para el

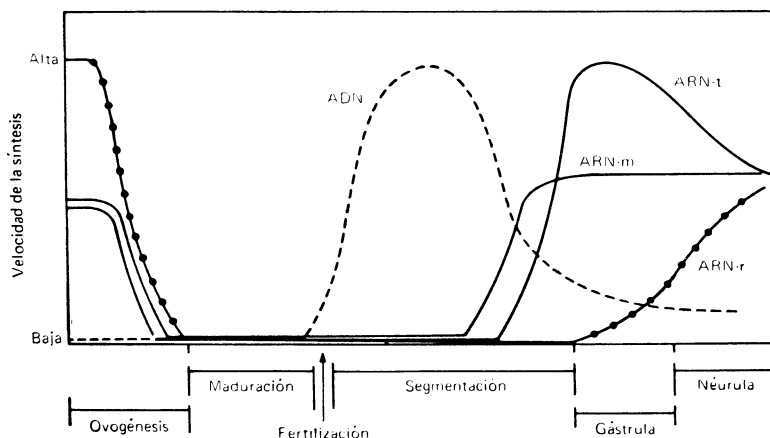


FIG. 20-2. Esquema de los principales cambios moleculares que tienen lugar en un huevo de anfibio, antes y después de la fertilización. (Véase la descripción en el texto.) (Cortesía de J. B. Gurdon.)

ARN 5 S, de 9 a 10 para los ARN 16 y 23 S y cerca de 40 para el ARN-t.¹⁸

La demostración de gran número de secuencias repetidas del ADN en células superiores fue consecuencia de las propiedades de reconocerse y reasociarse que poseen dos cadenas de ADN complementarias separadas. El proceso puede ser medido por técnicas de desnaturalización y renaturalización (véase cap. 4) y por otros métodos más precisos.¹⁹ Estos se basan esencialmente en el hecho de que la reasociación de las cadenas de ADN es tanto más rápida cuanto mayor sea el número de secuencias repetidas en sus moléculas. Así, en el ADN extraído del ratón, una fracción correspondiente al 10 por ciento del ADN total contenía secuencias cortas de nucleótidos, repetidas cerca de un millón de veces.²⁰ Como demuestra la figura 20-3, otro 20 por ciento del genomio consiste de secuencias repetidas de 1000 a 100.000 copias, mientras que el 70 por ciento restante está constituido por ADN no repetitivo, es decir, representado solamente una vez.

En el ternero, el 40 por ciento del ADN se dispone en secuencias repetidas, lo que corresponde a alrededor de $1,3 \times 10^9$ pares de nucleótidos por célula (esta cantidad equivale, por ejemplo, a 100.000 copias idénticas de $1,3 \times 10^4$ nucleótidos).

La presencia de secuencias repetidas se vincula con dos efectos genéticos diferentes: por un lado, reducir la cantidad de información genética total y, por el otro, amplificar ciertos genes específicos como en el caso de los cistrones ribosómicos. Sin embargo, el efecto puede ser más complejo y el contenido en información del ADN repetitivo ser mayor aún de lo que se pensaba, debido a que las secuencias de nucleótidos de una familia de estas moléculas son a veces similares pero no idénticas.

Hay indicios, incluso, de que muchas de las secuencias o fragmentos de ellas están ubicadas en diferentes partes del genomio. La semejanza de algunas de estas secuencias repetidas es común entre especies relacionadas, pero se desvanece a medida que aquéllas divergen. Los análisis al respecto cobran importancia desde el punto de vista de la taxonomía y la evolución.²¹ Se supone que en la evolución de los organismos las familias de ADN repetidas podrían haber surgido por una replicación abundante, y que luego esas copias se habrían integrado dentro del cromosoma y diseminado entre las especies por selección natural.¹⁹

Al estudiar el probable papel de las secuencias repetidas en la célula existe la posibilidad de que activen la síntesis de las proteínas estructurales requeridas en mayor cantidad. Así, en la formación de anticuerpos podrían suministrar la gran cantidad de proteínas similares que son producidas en poco

tiempo y lo mismo sucedería en el caso de la hemoglobina. El ADN repetitivo tendría gran importancia en la diferenciación celular, puesto que diferentes familias de genes podrían expresarse en distintos estadios de la vida celular y relacionarse con la producción de proteínas estructurales específicas (por ejemplo, actina y miosina en el músculo). Su posible papel en la regulación genética será mencionado más adelante.

Control de la expresión genética en células superiores

Una de las conclusiones más interesantes de los trabajos modernos sobre Biología molecular de cromosomas es que en las células eucariontes gran parte del ADN no funciona en la transcripción (es decir, no es activo en la síntesis de ARN). En párrafos anteriores se expresó que la mayoría del ARN celular, incluyendo el ARN-r y el ARN-t, está codificado por menos del 1 por ciento del genomio. La cantidad de ADN que codifica el ARN-m y otros tipos de ARN-s citoplásmicos y nucleares es probablemente menor del 5 por ciento. Esto indica que la mayor parte del ADN del genomio no es funcional en un momento dado.

En el núcleo interfásico (véase cap. 3), una porción de la cromatina puede presentarse en estado heterocromatínico superenroscado y el resto en un estado más laxo y extendido (eucromatina). Usando radioautografía con uridina- H^3 fue posible demostrar, en estudios de microscopía electrónica, que la mayor parte del ARN se sintetizaba en la eucromatina, mientras que la heterocromatina condensada

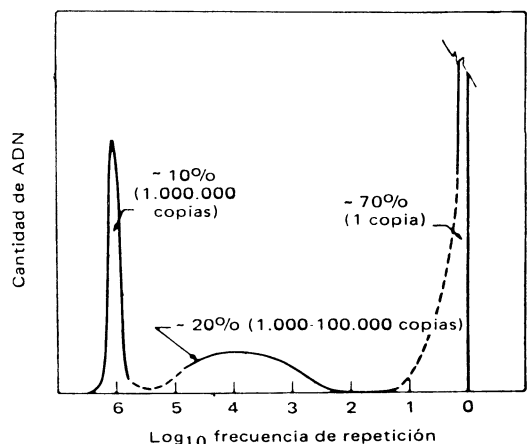


FIG. 20-3. Frecuencias de las secuencias repetidas de ADN en el ratón. (De R. J. Britten y D. E. Kohne.)

era inactiva.²² Durante la espermiogénesis, junto con la condensación del núcleo, la síntesis de ARN prácticamente cesa. El espermatozoide se asemeja mucho a un bacteriófago en el hecho de que ambos "inyectan" ADN: el primero en el óvulo y el segundo en bacterias. Otro ejemplo de la inactivación del ADN y de condensación cromatínica lo constituye el cromosoma metafásico, en el que la síntesis de ARN se reduce de modo considerable.²³ El lector deberá recordar también que en la hembra uno de los dos cromosomas X se heterocromatiza y se vuelve genéticamente inactivo.²⁴ Asimismo, la heterocromatina puede ser considerada como un estado sumamente plegado, que se correlaciona con la relativa inactividad genética (véase cap. 16).

La restricción en la síntesis del ARN se demuestra mediante el empleo de ARN y ADN aislados en experimentos de síntesis de ARN. Usando ARN-polimerasa bacteriana como enzima sintetizante, se encontró que la síntesis obtenida con cromatina aislada era sólo una fracción de la que se obtenía con el ADN. Además, el ARN formado por la cromatina de diferentes tejidos variaba, indicando que el enmascaramiento del ADN es organoespecífico.²⁵ Por medio de experimentos de hibridización se puso de manifiesto que la saturación del ADN con ARN era del orden del 40 por ciento, mientras que con la cromatina llegaba sólo al 5 por ciento.

Papel de las histonas

Varios investigadores han pensado que las histonas, por su estrecha asociación con el ADN durante ciertos estadios del ciclo celular son susceptibles de regular la actividad genética.²⁶⁻²⁸ *In vitro*, estas proteínas pueden inhibir completamente la producción del ARN a partir del ADN. Si las histonas fuesen los principales componentes que enmascaran la función del ADN, la regulación de la función genética podría modificarse mediante la acetilación, metilación o fosforilación de aquellas.²⁹ Todos estos cambios químicos tienden a reducir el grado de unión entre el ADN y las histonas.

Un sistema muy interesante es el de los pequeños linfocitos de la sangre humana, que presentan normalmente una cromatina densa, inactiva (reprimida). Después de pocos minutos de exposición a la *fitohematoaglutinina*, sustancia que se usa en cultivos de sangre para estudiar el cariotipo (véase cap. 15), las células evidencian signos de activación transformándose en grandes elementos "blastoides", susceptibles de dividirse.

Se producen una serie de cambios, comenzando por modificaciones de la permeabilidad al rojo neu-

tro y la inulina a nivel de la membrana plasmática. La síntesis de ARN nuclear aumenta notablemente, proceso que es precedido de la acetilación de las histonas cromosómicas.³⁰ La activación del núcleo se debería a la entrada de una proteasa lisosómica neutra (histonasa) con capacidad para digerir la cubierta histónica del ADN (Weissman y Hirschhorn, 1969).

Papel de las proteínas no histónicas y del ARN

En la actualidad se presume que las histonas actúan de un modo más general e inespecífico en el enmascaramiento del ADN³¹, en tanto que las proteínas ácidas desempeñarían un papel importante al activar las regiones del ADN reprimidas por su asociación con las histonas. Como ya fue mencionado en la sección precedente, las proteínas que provienen del citoplasma están probablemente vinculadas con la regulación del genomio. Más adelante se mencionará la importancia de las proteínas ácidas en los cromosomas politénicos.

Se ha sugerido que es necesario la existencia de una fracción de ARN ligada a las proteínas y presente en la cromatina para producir el control específico a nivel del genomio (Bekhor y col., 1969; Huang y Huang, 1969).

Diferencias en la regulación entre procariontes y eucariontes

En lo que respecta a la regulación genética, se advierte una diferencia fundamental entre las bacterias y las células superiores. Mientras que en las bacterias la represión genética es el principal mecanismo regulador (véase cap. 19), en los eucariontes la forma más frecuente de regulación estaría constituida por la *desrepresión* de regiones inactivas (reprimidas) del genomio. Además en las células superiores, debido a la presencia de varios cromosomas, la acción de los diferentes genes debe ser programada tanto en el espacio como en el tiempo. Un ejemplo es el de la *Drosophila*, en la cual los diversos genes que controlan la morfogénesis de los ojos se localizan en distintos cromosomas.

Se sabe asimismo que algunas hormonas pueden actuar sobre la transcripción "desreprimiendo" regiones del genomio. Otras evidencias indican que la regulación de la síntesis proteica es susceptible de ocurrir también a nivel de la traducción. Ello podría ser mediado por la formación de ARN-m estables y por cambios en las proteínas ribosómicas o en los ARN-t (ARN-t incompletos). La envoltura nuclear

(véase cap. 16) actuaría seleccionando los ARN nucleares que pasan al citoplasma. Recientemente, se ha observado en células HeLa sometidas a 42°C una disminución en la incorporación de aminoácidos y la fragmentación reversible de los polirribosomas. La adaptación al aumento de temperatura parece ser consecuencia de un factor que promueve la asociación de ribosomas libres con ARN-m (McCormick y Penman, 1969).

Ciertos autores atribuyen al ARN un posible papel en la regulación genética de células superiores (Britten y Davidson, 1969) y han propuesto un modelo más complejo que el que se aplica a las bacterias (véase cap. 19). Este modelo explica la activación sincrónica de varios genes que pueden no ser contiguos en el genomio y, aun, hallarse en cromosomas diferentes. Se considera que en las células superiores hay un notable aumento en el número y complejidad de los genes reguladores, más bien que en los estructurales. Diferentes estímulos (inductores), como hormonas esteroides o polipeptídicas, hormonas vegetales, vitaminas e inductores embrionarios, son capaces de activar simultáneamente varios genes. Ese efecto podría ser mediado por ARN-s activadores, codificados en ciertas regiones del genomio, bajo la influencia de los inductores. Un punto interesante de esta teoría es que los ARN-s activadores corresponderían a la fracción de ARN heterodisperso, el cual se halla confinado al núcleo y no es trasferido al citoplasma. En dicho modelo la función reguladora sería tarea principal del ADN repetido o redundante, que como ya se mencionó representa una gran parte del genomio en células superiores (fig. 20-3). Se sugiere que muchas de estas secuencias de ADN obrarían como receptoras de los distintos inductores, o producirían ARN-s activadores que actuarían sobre una batería de genes diferentes. De este modo un simple cambio molecular (por ejemplo, la acción de los estrógenos en el útero), puede producir muchos fenómenos integrados que se manifiestan a nivel de la transcripción y la traducción.

Control de la actividad genética en cromosomas politénicos

En el capítulo 3 se enunciaron los conceptos morfológicos esenciales acerca de los cromosomas politénicos. Estos han constituido un material muy valioso en el estudio de la expresión de la actividad genética. Todo comenzó al observarse variaciones locales en el tamaño y grado de condensación de las ban-

das, en momentos específicos del crecimiento larval de los insectos. Esas bandas aparecen como hinchazones localizadas, a las que se denomina *puff*. Los anillos de Balbiani son también de naturaleza similar aunque mucho más grandes.

La formación de *puff* (*puffing*) puede ocurrir en bandas aisladas o incluir bandas adyacentes. En los anillos de Balbiani los cromosomas que corren a lo largo de ciertas bandas son susceptibles de abrirse lateralmente y constituir una serie de volutas, presentando un aspecto similar a los cromosomas plumulados (véase cap. 3).^{32,33} El *puffing* es un proceso cíclico y reversible: los *puff* pueden aparecer, crecer y desaparecer en tiempos definidos y en diferentes tejidos de la larva.

En 1952, Beerman interpretó el *puffing* de los cromosomas politénicos como una expresión de la actividad genética. El desenrollamiento del ADN dentro de los *puff* se consideró como un requisito previo para la transcripción. En 1955, Pavan y Breuer,³⁴ mediante el empleo de timidina-H³, encontraron en ciertos *puff* de cromosomas politénicos de *Rhynchosciara angelae* una duplicación suplementaria de ADN. Este fenómeno se interpreta en la actualidad como una redundancia de ADN, relacionada probablemente con la formación de ARN-r en los nucléolos.

En la mayoría de los casos, el ARN y las proteínas se sintetizan o acumulan en el *puff*.³³⁻³⁶ Usando un marcado con pulsos cortos de citidina-H³, ésta se localiza casi exclusivamente en el *puff* y los nucléolos.^{35, 37} Un estudio de la composición de bases del ARN de diferentes porciones aisladas de células politénicas ha revelado que: a) el ARN cromosómico difiere del nucleolar o del citoplásmico, y b) el ARN de diferentes cromosomas y diferentes *puff* difieren entre sí.³⁸

El estudio del *puffing* puede realizarse experimentalmente apelando a agentes que estimulen su formación o cambien su actividad. La hormona esteroide *ecdisona*, secretada por la glándula protorácica de los insectos y que induce en ellos la muda, al ser inyectada a las larvas ocasiona, a su vez, la formación de *puff*.³⁹ Utilizando *ecdisona*-H³ se ha observado que la hormona se une a los sitios de *puffing* de los cromosomas. El *puffing* también es inducido por shock de temperatura u otros recursos.

Por medio de la coloración con verde claro (*light green*) a pH bajo, se demostró que el primer fenómeno en la inducción de los *puff* es la acumulación de una proteína ácida, que se puede reconocer en el sitio donde ha de constituirse el *puff* sólo tres minutos después del shock de temperatura (fig. 20-4). Dicha proteína no se sintetiza localmente, como es

posible comprobar usando aminoácidos marcados; pero no se sabe si proviene del citoplasma o del nucleoplasma.⁴⁰ Cabe destacar que en ese corto período no hay todavía incorporación de uridina- H^3 ; ésta aparece en una etapa más tardía, y aumenta considerablemente, indicando síntesis de ARN. Ello confirma la probable participación de las proteínas ácidas en el control de la expresión genética a nivel cromosómico.

En la formación de un *puff* completo intervienen sucesivamente los siguientes procesos: acumulación de proteínas ácidas, desespiralización del ADN, síntesis y acumulación de ARN. Si se inhibe completamente la síntesis de este último con actinomicina D, puede inducirse la formación de un *puff* de sólo un tercio del tamaño habitual, lo cual se exterioriza por la acumulación de la proteína ácida, que no es inhibida por el antibiótico. Podría inferirse que las células contienen un *pool* de proteínas que, al ser estimuladas, se movilizan y son capaces de reconocer regiones específicas del genomio.⁴⁰

Injectando actinomicina D en el momento en que el *puff* está completamente desarrollado y ha acumulado considerables cantidades de citidina- H^3 , es posible determinar el mo-

mento preciso en el cual el ARN sintetizado se libera. Como lo demuestra la figura 20-5, *d* y *e*, la mayor parte del ARN es eliminado del *puff* en 15 y 30 minutos, respectivamente.⁴⁰

Los *puff* y los anillos de Balbiani pueden ser interpretados como sitios en los cuales los genes son activos en la duplicación (ADN redundante) o, más frecuentemente, en la transcripción de moléculas específicas de ARN. Esta actividad génica es susceptible de correlacionarse con la producción de polipéptidos en las glándulas salivales y en otros tejidos de las larvas donde los cromosomas politénicos están presentes. Es posible que acúmulos de cistrones similares se hallen en el mismo *puff*, pero en la *Drosophila* se encuentra más de un gene en una misma banda. En el control del *puffing* podría intervenir el citoplasma, puesto que en núcleos aislados la ecdisona o el shock de temperatura no tienen efecto inductor. En diversos tejidos de *Rhyncosciara*, infectada con un microscoporo, se observó que el parásito produce una notable hipertrofia de los cromosomas politénicos.⁴¹

Los estudios citoquímicos de los cromosomas plumulados pusieron de manifiesto su similitud con los cromosomas politénicos y con el fenómeno del *puffing*. También en este caso los precursores del ARN (por ejemplo, uridina- H^3) son captados por algunas de las asas que comienzan en el extremo delgado y pro-

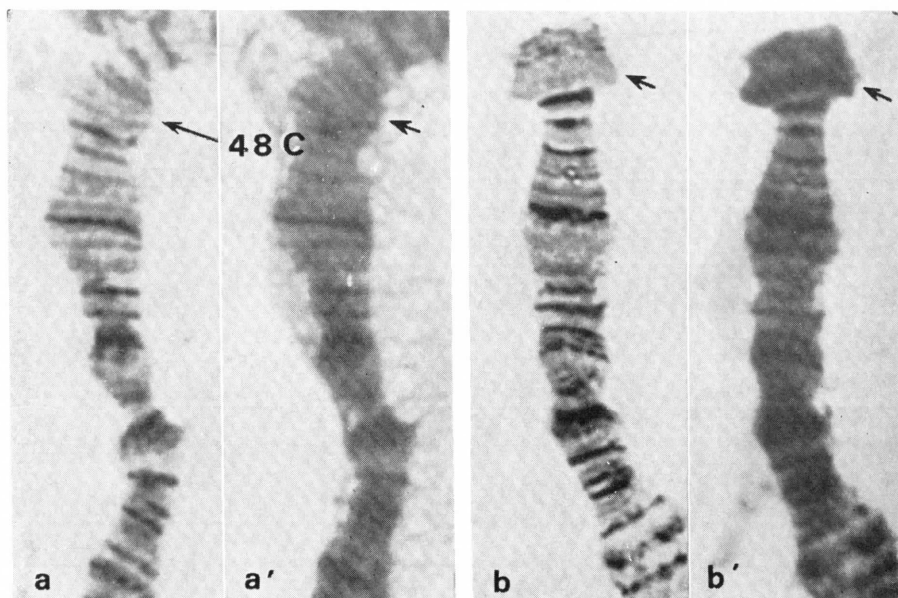


FIG. 20-4. Cromosomas politénicos de *Drosophila hydei* mostrando la acumulación de proteína ácida en la región del *puff* 48 C. *a* y *a'* Controles. *b* y *b'* Tres minutos después de la acción de la temperatura (de 25 a 37°C). *a* y *b* Fotografiados con filtro verde para demostrar el ADN, y *a'* y *b'*, con filtro rojo, para poner de manifiesto las proteínas ácidas. Adviértase que éstas se acumulan ya a los 3 minutos. (Cortesía de H. D. Berendes.)

gresan en unos pocos días hacia el extremo grueso. Este material de ARN es inhibido por la actinomicina y, al parecer, se trata de ARN-m. La síntesis proteica también tiene lugar cerca del asa. Cuando concluye la actividad sintética de ésta el material de ARN es liberado junto con el colapso de dicha estructura.⁴²

División celular y diferenciación celular

Se acepta generalmente que existe cierto antagonismo entre la división y la diferenciación celulares, aunque ello no siempre es de regla, y en células diferenciadas como las del ácino pancreático, los hepatocitos y las células renales pueden verse figuras mitóticas. La diferenciación tiene lugar fundamentalmente durante la interfase entre las mitosis o, en el caso de células nerviosas, después que las divisiones celulares han cesado definitivamente. Los neuroblastos, que se originan de células indiferenciadas del tubo neural embrionario y de la cresta neural, alcanzan un alto grado de diferenciación, de manera que la célula nerviosa pierde no sólo su capacidad de transformarse en otros tipos celulares sino también de dividirse.

Ejemplos interesantes del antagonismo entre diferenciación celular y división celular se encuentran en las denominadas "células troncales". En distintos tejidos, después de la división celular, una de las células hijas comienza a diferenciarse y ya no se divide, mientras que la otra permanece indiferenciada y continúa realizando mitosis. En el epitelio intestinal del ratón se ha observado que cada célula alcanza un punto en el cual debe "decidirse". Este tiene lugar poco tiempo después de la mitosis, antes que comience la síntesis del ADN en las células hijas. El destino de la célula depende aparentemente de su posición con respecto a las otras en la misma vello-sidad.⁴³

La síntesis específica de una proteína como la miosina excluiría la síntesis simultánea del ADN. En un momento definido, existe un mecanismo de "decisión" en la célula,⁴⁴ por el cual se elige una u otra vía sintética. Aunque el mecanismo íntimo de esta selección es todavía desconocido, implica un cambio por parte del genomio, tanto para la duplicación como para la trascripción.

Renovación de poblaciones celulares

La estimación del número de células en un tejido puede realizarse determinando el contenido de ADN^{45, 46} (véase cap. 17).

La figura 20-6 pone de manifiesto las posibilidades de este método. Analizando el contenido de ADN de una rata entera, desde el estadio embrionario hasta el adulto, puede

calcularse que: 10 días antes del nacimiento existen alrededor de 50 millones de células, en el momento del nacimiento 3.000 millones, y 90 días después 67.000 millones.⁴⁵ Dicho método permite también determinar el *aumento del número de núcleos por día* y la cantidad de material que se asocia con un núcleo. Este índice, denominado *peso por núcleo* (peso del órgano dividido por el número de núcleos), se eleva con el incremento del tamaño celular y con la acumulación de material intercelular (fig. 20-6).

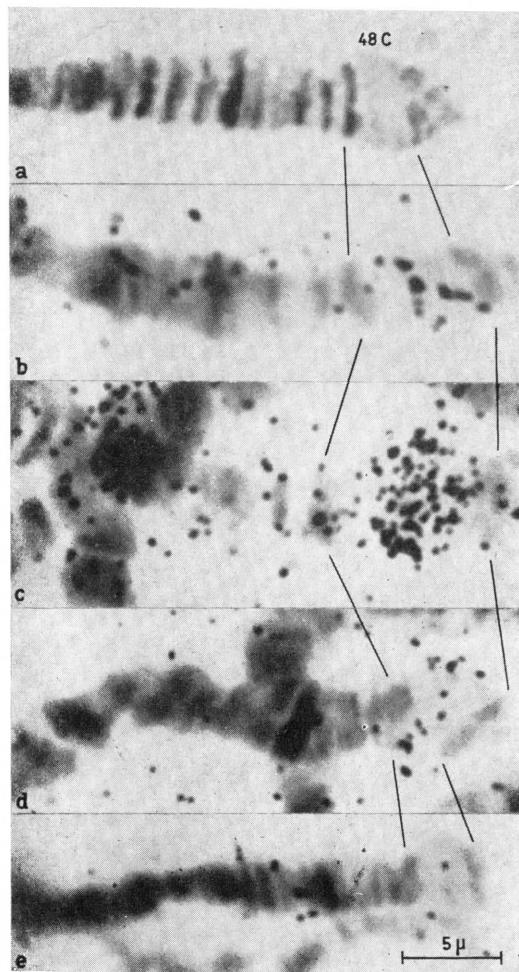


FIG. 20-5. Experimento que demuestra la forma de incorporación de la uridina- H^3 en el puff 48C de *Drosophila hydei*. a Control; b, 3 minutos después de la acción de la temperatura (se ven pocos granos de plata depositados); c, 15 minutos después se observa el gran aumento en la incorporación; d, 15 minutos después de actinomicina D inyectada en la larva al tiempo c; e, 30 minutos luego del antibiótico. Estos resultados indican que la mayor parte del ARN sintetizado es eliminado del puff después de 15 a 30 minutos. (Cortesía de H. D. Berendes.)

La *velocidad mitótica* de un tejido se deduce inyectando *colchicina*, que detiene las divisiones celulares en el período de metafase. La colchicina se administra generalmente en intervalos de seis horas, calculándose la velocidad mitótica diaria en un período de 24 horas. Sin embargo el mejor método para estudiar células en división es el radioautográfico después de la inyección de timidina- H^3 .⁴⁷

Población celular durante la vida embrionaria

El embrión de la rata contiene 50 millones de células 10 días antes del nacimiento, es decir, a los 12 ó 13 días de su vida embrionaria (la vida embrionaria total en la rata es de 22 a 23 días). Suponiendo que a partir del huevo las divisiones son regulares y sin pérdidas celulares, es posible calcular que se han producido de 25 a 26 generaciones de células, con un período de división de medio día.

En otras palabras, en el embrión joven el número de células será el doble cada medio día. En los últimos diez días de la vida embrionaria el período de duplicación aumenta a 1,7 días y el crecimiento es más lento; el número de células al nacer es de 6.000 millones (fig. 20-6). El estudio con timidina- H^3 en el decimosexto día del embrión de rata revela que la mayoría de las células se encuentran en división y que ésta sólo ha cesado en algunas células nerviosas.

Clasificación de las poblaciones celulares

El estudio del crecimiento y renovación de las poblaciones celulares durante la vida posnatal ha conducido a su clasificación en tres grupos: a) poblaciones *estáticas*; b) poblaciones en *expansión* y c) poblaciones en *renovación*.⁴⁸

a) Se define a las poblaciones celulares es-

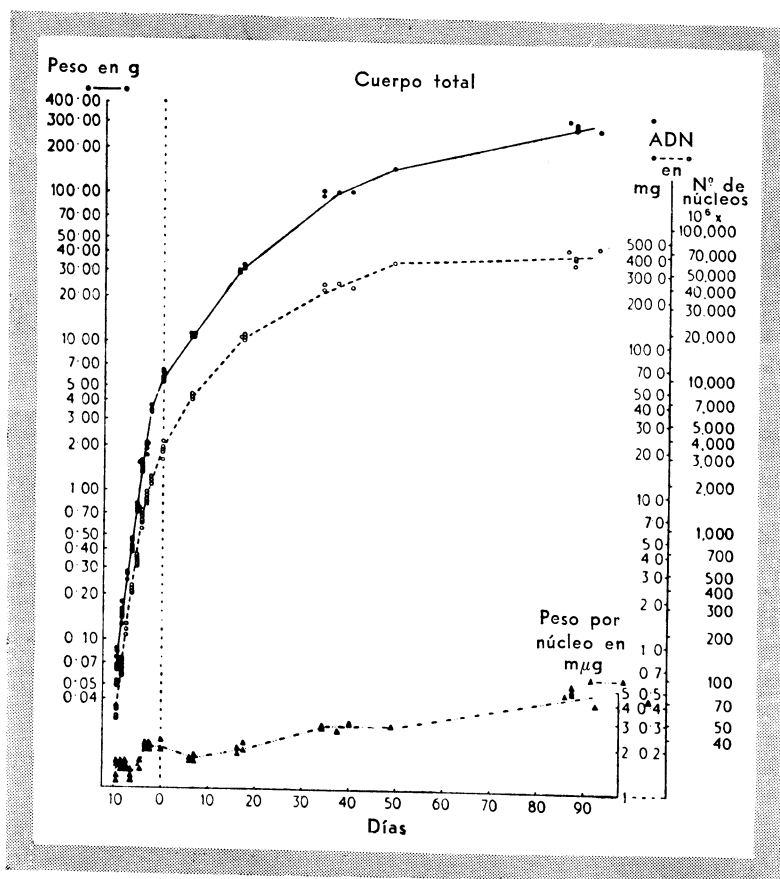


FIG. 20-6. Representación semilogarítmica del peso en gramos (puntos), del ADN en miligramos (círculos) y del peso por núcleo en $m\mu g$ (triángulos) de todo el cuerpo de la rata, en relación con la edad en días. El ADN se expresa tanto en miligramos como en número de núcleos. El tiempo 0, corresponde al nacimiento de la rata. Puede observarse que en el período prenatal existe un rápido crecimiento en el peso y en el contenido de ADN. (De M. Enesco y C. P. Leblond.⁴⁵)

táticas como grupos homogéneos de células en las cuales no se registra actividad mitótica y el contenido total de ADN permanece constante. Todas las células nerviosas, sean centrales o periféricas dejan de dividirse en la rata después de los siete días de edad. Las células musculares estriadas, que se incluían en este grupo, muestran mitosis y deberán ser clasificadas en el segundo de ellos. No todas las células del sistema nervioso pertenecen a la población estática, puesto que algunas células neuróglícas y subependimarias de animales jóvenes incorporan timidina marcada. Una de las características más importantes de las células estáticas es que, paralelamente al crecimiento del organismo, el volumen celular aumenta de manera constante y es proporcional al volumen total del cuerpo.⁴⁹

b) *Las poblaciones celulares en expansión comprenden grupos homogéneos de células en las que se observan mitosis dispersas, en un número acorde con el aumento del contenido total de ADN.* Ello implica que la vida de cada célula se extiende durante toda la del individuo y que se producen nuevas células por mitosis sólo en relación con el crecimiento del tejido.

La determinación cuantitativa del ADN revela un aumento progresivo en el número de núcleos, pero el ritmo mitótico decrece con la edad. Tratando las células con colchicina y timidina-H³, se aprecia que algunas células dispersas están en mitosis.

Son ejemplos de poblaciones celulares en expansión: el páncreas, tiroides, riñón, suprarrenales y glándulas salivales.

Una característica relevante de las células en expansión es que el índice mitótico —normalmente muy bajo— aumenta bruscamente con estímulos adecuados. Así, después de la extirpación parcial del hígado o de una nefrectomía unilateral existe una rápida regeneración e hipertrofia.

En el caso del hígado se puede suponer que normalmente produce sustancias inhibitorias de su propio crecimiento. La extirpación parcial reduciría la cantidad de inhibidores circulantes permitiendo, por tanto, mayores divisiones celulares.^{50,51}

c) *Las poblaciones celulares en renovación son grupos homogéneos de células, en las cuales el número de mitosis es abundante y excede a las requeridas para que aumente el contenido total en ADN.* En poblaciones en renovación,

la producción elevada de células se encuentra equilibrada por la correspondiente pérdida celular. Los eritocitos, cuya vida media es de 120 días, constituyen un ejemplo.

Con timidina-H³ se puede demostrar la rápida renovación de las células en el intestino (fig. 7-17). Lo propio ocurre en la epidermis, donde las células se renuevan rápidamente para reemplazar a aquellas que se desprenden en la superficie. Este proceso es aún más acentuado durante la regeneración que se produce en la cicatrización de las heridas.

A las poblaciones en renovación pertenecen también los testículos, que liberan continuamente espermatozoides; el pulmón que produce "células pulverulentas", el timo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y todos los órganos hemopoyéticos en general. La renovación celular es asimismo continua en las glándulas sebáceas.

INTERACCIÓN CELULAR

Intimamente relacionado con el problema de la biología molecular de la diferenciación celular se encuentra el de la interacción celular. En un organismo multicelular, las células de los distintos tejidos especializados cooperan en forma armónica y existe entre ellas un alto grado de interdependencia funcional. La interacción celular puede producirse a distancia, por medio de la difusión de algunas sustancias químicas; pero en muchos casos depende de una acción más circunscrita, que puede denominarse *contacto celular*. Así, para asegurar que los grupos celulares semejantes guarden una relación espacial correcta, se necesita cierto tipo de contactos celulares especializados (véase cap. 9). Durante el desarrollo embrionario, y también en determinadas circunstancias en los organismos adultos (por ejemplo, regeneración o reparación celular), existe una gran motilidad celular y el movimiento en masa de células. Uno de los casos más interesantes de migración celular es el de las células germinativas. En embriones de aves, éstas se diferencian en el endodermo extraembrionario, mientras que el resto de la gónada se desarrolla en la cresta germinal del mesodermo embrionario. Las células germinativas penetran en el torrente circulatorio y son llevadas a través de todo el embrión, pero se adhieren selectivamente y se acumulan en las crestas germinales. De lo dicho se infiere que existe entre ellas un tipo

de *reconocimiento específico*, que es también de gran importancia en el desarrollo del sistema nervioso, en donde millones de neuronas deben encontrar a sus compañeras en forma específica para establecer uniones sinápticas.

Adhesión celular

Para constituir agregados, las células primero deben ponerse en contacto por medio de una matriz intercelular común.⁵² Como se indicó en el capítulo 9, la microscopía electrónica ha sido un recurso fundamental en la determinación morfológica de los distintos tipos de contactos celulares. De ellos, se describen a continuación los tres más importantes.

1) *La agregación resulta de la inclusión de la célula en una matriz común.* En la mayor parte de los casos, la matriz extracelular consta de las denominadas *cubiertas extrañas*, sustancias que muchas veces (por ejemplo, celulosa, ácido hialurónico y otros) se acumulan después que las células se han puesto en contacto.

2) *La agregación tiene lugar con poca o ninguna sustancia intercelular demostrable.* La microscopía electrónica revela que la distancia entre las células es, bastante frecuentemente, del orden de los 150 Å (fig. 9-4). La posibilidad de que dichos contactos se deban a propiedades físicas de la membrana (fuerzas de repulsión y atracción) ha sido considerada por varios investigadores.⁵³ Sin embargo, los trabajos de microscopía electrónica indican que aun en estos pequeños espacios intercelulares debería existir alguna sustancia, posiblemente una mucoproteína, responsable de la especificidad de la asociación celular. Esta presunción se funda en el hecho de que las enzimas más efectivas para separar las células son las proteasas y las mucasas.

3) *La agregación implica la presencia de canales intercelulares.* Ello determina que las células de un tejido sean susceptibles de intercambiar material más o menos libremente. En células vegetales, se reconocieron hace tiempo puentes citoplásmicos o plasmodesmos (fig. 2-4), que proporcionan conexiones entre las células y a través de las paredes celulósicas, permitiendo el paso libre de iones y, probablemente, de algunas macromoléculas.

Comunicación celular y acoplamiento eléctrico

En células animales ha sido demostrada la presencia frecuente de comunicaciones celulares.⁵⁴ Empleando microelectrodos se observó que entre las células puede existir un acoplamiento eléctrico, el cual implica una menor resistencia y el pasaje relativamente libre de corriente eléctrica y iones.^{56,57} Esas uniones están relacionadas habitualmente con la aparición de uniones estrechas (véase cap. 9).

Entre las células embrionarias se halla un gran número de estas comunicaciones⁵⁸, que en el embrión de pollo persisten hasta poco antes de producirse la salida del cascarón.⁵⁷

A menudo las células de tejidos adultos están acopladas eléctricamente, como sucede por lo común en el caso de los epitelios⁵⁹ y de las células hepáticas que comunican entre sí.⁶⁰

Un hallazgo importante lo constituyen las *células cancerosas* (por ejemplo, de cánceres hepáticos⁶¹), carentes por lo general de *comunicaciones intercelulares*. El músculo esquelético y las neuronas que establecen sinapsis químicas tampoco poseen acoplamiento eléctrico.

A través de esas comunicaciones intercelulares los iones pueden pasar libremente, e incluso lo hacen colorantes con un peso molecular de hasta 1000 Daltons. El sistema de comunicación intercelular provee el modo de enviar algún tipo de señal entre las células. El flujo de información concerniente a la actividad genética y que puede determinar la iniciación y el mantenimiento de la diferenciación celular, probablemente se lleve a cabo a través de dichas comunicaciones intercelulares. Es interesante destacar que las uniones celulares citadas son sumamente lábiles. Dependen, fundamentalmente, del Ca^{++} y del Mg^{++} y pueden ser afectadas por factores que influyen sobre la permeabilidad de estos cationes.

En las células gigantes de las glándulas salivales de *Chironomus*, están subordinadas a la energía que proporciona la fosforilación oxidativa (ATP). Los tratamientos que inhiben el metabolismo celular (enfriamiento a 6-8°C, dinitrofenol, cianuro y oligomicina) producen el desacople de las células, proceso que es reversible por la inyección de ATP. Se cree que este desacople es debido a la entrada de Ca^{++} exógeno o mitocondrial durante la acción de los inhibidores. Para que existan las comunicaciones intercelulares sería necesaria la presencia de un gradiente con altas concentraciones de Ca^{++} en el medio y bajas concentraciones en el citoplasma (Politoff y col., 1969).

Disociación y reasociación celular

En 1908 Wilson comprobó que las esponjas vivas forzadas a pasar a través de un filtro de seda delgada se disociaban en células aisladas móviles, que después de cierto tiempo eran susceptibles de reagruparse y constituir nuevos individuos. De este modo se pudieron mezclar esponjas con células de diferen-

tes colores, formándose a partir de ellas organismos de colores mixtos. Posteriormente, se demostró que los tejidos embrionarios tratados con tripsina se disgregan en células individuales, las que después se asocian para recomponer los tejidos originales.⁶²

El proceso de reasociación depende de la motilidad celular. Si todas las células de un embrión de pollo se disocian con tripsina y luego se les permite reposar, se reasocian espontáneamente, pero este proceso puede modificarse controlando de manera voluntaria el movimiento de las células para aumentar las colisiones al azar. Cuando las células similares chocan entre sí, tienden a agregarse en forma característica para cada tipo de población celular.⁶³

La reasociación no es específica desde el punto de vista taxonómico. Si se mezclan células de embriones de pollo y de ratón, éstas se reasocian más según el tipo celular que conforme a la especie. La reasociación no ocurre en ausencia de iones de calcio, o si el tratamiento usado para disociar el tejido bloquea selectivamente ciertos hidratos de carbono y glucoproteínas. En las células de la retina, el proceso puede ser inhibido utilizando puromicina, un inhibidor de la síntesis proteica dependiente del ARN.⁶⁴

El mecanismo por el cual las células pueden “reconocerse” y asociarse con otras de tipo similar se produce en la superficie celular, pero su naturaleza íntima es desconocida. Se ha sugerido que la superficie de la célula tiene un alto grado de ordenamiento en sentido tangencial, hecho que se refleja en la organización espacial de los grupos ácidos ionizados que ligan Ca^{++} y Mg^{++} .⁶⁵

El material de superficie de las células adyacentes se halla probablemente formado, en el nivel molecular, por el encaje de grupos reactivos. Nombres como “reconocimiento mutuo” de poblaciones celulares, “codificación de superficie” y “afinidad preferencial” se han empleado para explicar este mecanismo, con el cual se vinculan las interacciones inmunoquímicas.⁶⁶ Las propiedades y la constitución bioquímica de la superficie celular y de las enzimas específicas que se encuentran en ella son de interés creciente en Biología celular, y la rama que las estudia, denominada *ectobiología*, se halla actualmente en rápido desarrollo.

Inhibición de contacto. Células cancerosas

Este interesante fenómeno consiste en la *inhibición de la motilidad celular y también de la actividad mitótica*, que se observa cuando las células en cultivo se ponen en contac-

to.⁶⁷ Ello sucede frecuentemente en los casos en que el cultivo crece sobre un soporte sólido como una superficie de vidrio o un filtro millipore. Una vez que las células flotan libremente en su medio nutritivo, se dividen por lo general cada 24 horas. Sin embargo, cuando se ponen en estrecho contacto en una monocapa, la velocidad de la mitosis disminuye y existe una inhibición de la división celular. Este fenómeno puede comprobarse fácilmente usando timidina- H^3 , cuya incorporación constituye una medida de la velocidad de síntesis del ADN. La inhibición depende más de alguna señal desconocida entre las células en contacto que de una sustancia difusible que actúa a distancia. Es importante recordar que una de las principales diferencias entre las células normales y las cancerosas, es la falta de inhibición de contacto que poseen las últimas. En células cancerosas la velocidad mitótica no está inhibida y en los cultivos de tejido tienden a apilarse formando masas irregulares de varias capas de profundidad. Estas células evidencian una menor adhesión tanto al soporte sólido como entre sí y su motilidad es mucho más pronunciada. Dichas propiedades explican la causa por la cual los neoplasmas invaden otros tejidos y siguen un crecimiento incontrolado. La pérdida de la inhibición de contacto se pone de manifiesto en células de cultivos normales que son “transformadas” en células cancerosas por medio de virus oncogénicos (virus capaces de inducir cáncer), como el del poliovirus. En ellas se han observado cambios en las propiedades de superficie; por ejemplo, con el empleo de una técnica específica para mucopolisacáridos (reacción de Hale) fue posible demostrar el aumento considerable de las sustancias,⁶⁸ verificándose por otra parte que existe una elevación de la motilidad electroforética.⁶⁹ Tanto las propiedades tintoriales como la motilidad se reducen por la acción de la neuraminidasa, enzima que desdobla el ácido siálico (ácido neuramínico) de las glucoproteínas. La observación con el microscopio electrónico revela que las uniones estrechas tienden a desaparecer en células transformadas por el virus oncogénico. Ello puede explicar la falta de acoplamiento eléctrico entre las células cancerosas, como se mencionó anteriormente. Usando rojo de rutenio para la tinción de mucopolisacáridos, se encontró un gran aumento del espesor⁷⁰ de las cubiertas extrañas que cubren la superficie celular.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abercrombie, M.: (1967) Contact Inhibition. The Phenomena and its biological implications. *Nat. Cancer Inst. Monogr. (Wash.)*, 26:249.
- Bekhor, I., Kung, C. M. and Bonner, J.: (1969) Sequence specific interaction of DNA and chromosomal protein. *J. molec. Biol.*, 39:351.
- Brachet, J.: (1967) Exchange of macromolecules between nucleus and cytoplasm. *Protoplasma*, 63 (1-3):86.
- Brachet, J.: (1968) Quelques aspects moléculaires de la cytologie et de l'embryologie. *Biol. Rev.*, 43:1.
- Britten, R. J. and Davidson, E. H.: (1969) Gene Regulation for higher cells: a theory. *Science*, 165:349.
- Grobstein, C.: (1967) Mechanisms of organogenetic tissue Interaction. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 26:279.
- Gurdon, J. B.: (1968) Nucleic acid synthesis in embryos and its bearing on cell differentiation. *Essay Biochem.*, 4:26.
- Gurdon, J. B. and Wooland, H. R.: (1968) The cytoplasmic control of nuclear activity in animal development. *Biol. Rev.*, 43:233.
- Harris, H., Sidebottom, E., Grace, D. M. and Bramwell, M. E.: (1969) The expression of genetic information. *J. Cell Sci.*, 4:449.
- Huang, R. C. C. and Huang, P. C.: (1969) Effect of protein bound RNA associated with chick embryo chromatin on template specificity of the chromatin. *J. molec. Biol.*, 39:365.
- McCormick, W. and Penman, S.: (1969) Regulation of protein synthesis in HeLa cells. *J. molec. Biol.*, 39:315.
- Politt, A. L., Socolar, S. J. and Lewenstein, W. R.: (1969) Permeability of a cell membrane junction. *J. gen. Physiol.*, 53:498.
- Wagner, R. P. (ed.): (1969) *Nuclear Physiology and differentiation genetics*, 61(1).
- Weissmann, G. and Hirschhorn, R.: (1969) Mechanisms of lymphocyte stimulation: From the cell membrane to wide spread gene activation. *First Int. Symp. Cell Biol. and Cytopharmacol.*, Venice, July 7-11.
10. Gurdon, J. B.: (1962) *J. Embryol. exp. Morph.*, 10:622.
11. Gurdon, J. B.: (1962) *Dev. Biol.*, 4:256.
12. Briggs, R. and King, T. J.: (1960) *Develop. Biol.*, 2:252.
13. King, T. J. and Briggs, R.: (1955) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 41:321.
14. Harris, H.: (1967) *J. Cell Sci.*, 2:23.
15. Mazia, D.: (1966) Biochemical aspects of mitosis. In: *The cell nucleus, metabolism and radiosensitivity*, p. 15. London Taylor and Francis.
16. Himes, M.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:175.
17. Mortimer, R. K.: (1969) *Int. Symp. on nuclear Physiol. and Different. Genetics*, 61:329.
18. Smith, I., Dubnau, D., Morell, P. and Marmur, J.: (1968) *J. molec. Biol.*, 33:123.
19. Britten, R. J. and Kohne, D. E.: (1968) *Science*, 161:1529.
20. Waring, M. and Britten, R. J.: (1966) *Science*, 154:791.
21. Martin, M., Hoyer, B. H.: (1966) *Biochemistry*, 5:2706.
22. Bloch, D. D.: (1963) *Proc. XIV Int. Congress Zool. (Wash.)*, 3.
23. Bonner, J. and Huang, R. C.: (1963) *J. molec. Biol.*, 6:169.
24. Frenster, J. H., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 50:1026.
25. Littau, V. C., Allfrey, V. G., Frenster, J. H. and Mirsky, A. E.: (1954) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 52:93.
26. Konrad, C. G.: (1963) *J. Cell Biol.*, 19:267.
27. Grumbach, M., Morishima, A. and Taylor, J. H.: (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 49:581.
28. Paul, J. and Gilmour, R. S.: (1968) *J. molec. Biol.*, 34:305.
29. Allfrey, V. G.: (1968) *Excerpta med. Int. Congr.*, Ser. 166:28.
30. Pogo, G. G. T., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55:805.
31. Comings, D. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:669.
32. Beerman, W.: (1961) *Chromosoma*, 12:1.
33. Beerman, W.: (1962) *Protoplasmatologia VI*. D. Wieu, Springer.
34. Pavan, C. and Brever, M.: (1955) *Symp. Cell Secretion*, Bello Horizonte, 90.
35. Peling, G.: (1959) *Nature*, 184:655.
36. Swift, H.: (1962) In: *Molecular control of cellular activity*, p. 73. (Allan, J. M., ed.) McGraw-Hill Book Co., New York.
37. Sirlin, J. L.: (1960) *Exp. Cell Res.*, 19:177.
38. Edström, J. E. and Beerman, W.: (1962) *J. Cell Biol.*, 14:371.
39. Clever, U. and Karlson, P.: (1960) *Exp. Cell Res.*, 20:623.
40. Berendes, H. D.: (1968) *Chromosoma*, 24:418.
41. Pavan, C. and Parondini, A. L. P.: (1967) *Exp. Cell Res.*, 48:202.
42. Gal, I. G. and Callan, H. C.: (1963) Structure and function of Lampbrush chromosomes. *Proc. XIV Internat. Congress Zool. (Wash.)*, 3:280.
43. Quastler, H. and Sherman, F.: (1959) *Exp. Cell Res.*, 17:420.
44. Abbott, J. and Holtzer, H.: (1966) *J. Cell Biol.*, 28:473.
45. Enesco, M. and Leblond, C. P.: (1962) *J. Embryol. Exp. Morph.*, 10:530.
46. Nowinski, W. W.: (1960) *Fundamental aspects*

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Cairns, J.: (1963) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 28:43.
2. Fronbrune, P.: (1949) *De technique de micro-manipulation*. Masson et Cie., Paris.
3. Lorch, I. J. and Danielli, J. F.: (1960) *Nature*, 166:329.
4. Goldstein, L., Cailleau, R. and Crockett, T. T.: (1960) *Exp. Cell Res.*, 19:332.
5. Hammerling, J.: (1963) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 14.
6. Keck, K.: (1963) The nuclear control of synthetic activities in Acetabularia. *Proc. XIV Int. Congress Zool (Wash.)*, 3:203.
7. Hamerling, J.: (1953) *Int. Rev. Cytol.*, 2:475.
8. Gurdon, J. B. and Wooland, H. R.: (1968) *Biol. Rev.*, 43:233.
9. Graham, C. F., Arms, K. and Gurdon, J. B.: (1966) *Develop. Biol.*, 14:439.

- of normal and malignant growth*. Elsevier Pub. Co., Amsterdam.
47. Hughes, W. L., Bond, V. P., Brecher, G., Cronkite, E. P., Painter, R. B., Quaster, H. and Sherman, F. G.: (1958) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 44:476.
 48. Leblond, C. P.: (1964) *J. Nat. Cancer, Inst.*, 14:119.
 49. Levi, G.: (1934) *Ergebn. Anat. Entw. Gesch.*, 31:398.
 50. Glinos, A. D. and Gey, G. O.: (1952) *Proc. Soc. exp. Biol., Med.*, 80:421.
 51. Stich, H. F. and Florian, M. L.: (1958) *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 36:855.
 52. Harris, R. J. C.: (1961) Cell movement and cell contact. *Exp. Cell Res.*, Suppl. 8. Academic Press, New York.
 53. Curtis, A. S. G.: (1962) *Biol. Rev.*, 37:82.
 54. Loewenstein, W. R.: (1967) *Develop. Biol.*, 15:503.
 55. Loewenstein, W. R.: (1968) *Perspect. Biol. Med.*, 11:260.
 56. Loewenstein, W. R. and Kanno, Y.: (1964) *J. Cell Biol.*, 22:565.
 57. Potter, D. D., Furshpan, E. J. and Lennox, E. S.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 55:328.
 58. Ito, S. and Hori, N.: (1966) *J. gen. Physiol.*, 49:1019.
 59. Loewenstein, W. R.: (1966) *N. Y. Acad. Sci.*, 137:441.
 60. Penn, R. D.: (1966) *J. Cell Biol.*, 29:171.
 61. Loewenstein, W. R. and Kanno, Y.: (1967) *J. Cell Biol.*, 33:225.
 62. Moscona, A.: (1957) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 43:184.
 63. Moscona, A.: (1962) *J. cell comp. Physiol.*, 60:65.
 64. Moscona, M. and Moscona, A.: (1963) *Science*, 142:1070.
 65. Steinberg, M. S.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 28:1.
 66. Burnet, F. M.: (1961) *Science*, 133:307.
 67. Abercrombie, M.: (1966) *Conf. on Tissue and Organ Culture*, p. 249, Bedford, Penna.
 68. Deffendi, V. and Gasic, G.: (1963) *J. cell. comp. Physiol.*, 62:23.
 69. Forrester, J. A., Ambrose, E. J. and Stoker, M.: (1964) *Nature*, 201:945.
 70. Martinez-Palomo, A. and Brailowsky, C.: (1968) *Virology*, 34:379.

OCTAVA PARTE

FISIOLOGIA CELULAR

Los cinco capítulos siguientes tratan de algunas de las funciones celulares más importantes que no se incluyeron en capítulos previos. Estos procesos fisiológicos se estudian en estrecha relación con la estructura y organización química de las células.

En el capítulo 21, con el encabezamiento de Permeabilidad celular, se agrupan todos los procesos mediante los cuales la célula regula la entrada y salida de diferentes iones y moléculas. Se enuncian los importantes conceptos de difusión pasiva y transporte activo, y se puntualiza su relación con las concentraciones osmótica e iónica de la célula y con los potenciales de membrana. En ésta, se sugiere la existencia de poros, cargados eléctricamente o no, y de sistemas enzimáticos (de permeasa) que coadyuvan en el transporte específico de compuestos químicos a través de la membrana. Se destaca, asimismo, la importancia de las ATPasas en el transporte iónico. Además de los mecanismos que aseguran la penetración de sustancias en estado molecular, hay otros menos específicos de ingestión masiva de sólidos y fluidos, denominados genéricamente fagocitosis y pinocitosis (endocitosis). Estos procesos están íntimamente vinculados con los de digestión, así como con la presencia de lisosomas —partículas que contienen enzimas hidrolíticas— y de peroxisomas o microcuerpos, portadores de algunas oxidasas. El lector reconocerá la importancia de los lisosomas en la fisiología de la célula y en muchas condiciones patológicas.

El capítulo 22 está dedicado a los tipos más primitivos de movimiento celular: los movimientos ciliar y flagelar, las corrientes citoplásmicas o ciclo-sis y el movimiento ameboide. La complicada ultraestructura de las cilias y los cuerpos basales, semejante a la de los centriolos, también será descrita en esta sección junto con la bioquímica ciliar. Dichos conceptos constituyen una introducción al análisis del movimiento ciliar y de los derivados ciliares, y al estudio del origen y multiplicación de estos organoides, enriquecido por modernos conocimientos.

En el mismo capítulo se considera al microtúbulo como una estructura citoplásmica fibrilar presente en la mayor parte de las células, teniendo en cuenta su posible papel en los procesos de contracción y movimiento celulares, circulación y transporte de productos, y diferenciación y mantenimiento de la forma de la célula.

Debido a sus interrelaciones, todos los procesos mencionados, así como las estructuras que les sirven de base, se examinarán en forma integrada.

En el capítulo 23 se considera al músculo como un ejemplo extraordinario de maquinaria macromolecular adaptada al trabajo de la contracción. Ésta puede ser explicada como la resultante de la interacción de proteínas fibrosas especiales: actina, miosina y tropomiosina, susceptibles de ser identificadas con el microscopio electrónico en la estructura íntima de la fibra muscular. El soporte estructural que proporciona el retículo sarcoplásmico permite explicar la conducción del potencial de acción en el interior de la fibra muscular y la sincronización funcional de las miofibrillas. El músculo es un ejemplo admirable

de interacción fisiológica y estructural, comparable sólo a las mitocondrias y cloroplastos.

El capítulo 24 establece las bases celulares de la conducción nerviosa y de la transmisión sináptica. Tanto el músculo como los tejidos nerviosos conducen impulsos mediante potenciales de acción, pero el tejido nervioso está especialmente adaptado a la recepción de estímulos, la transmisión de impulsos a través de la sinapsis y la inducción de respuestas a nivel de los efectores. Las relaciones entre estructura y función en la fibra nerviosa dependen de su diámetro, de la presencia y espesor de la vaina de mielina y de la distancia internodal. En las fibras no mielínicas el proceso de conducción implica un cambio en el potencial de membrana que produce el impulso nervioso. Éste es conducido sin decremento, según la ley del *todo o nada*. En fibras mielínicas el potencial de acción salta en apariencia de un nodo al otro (conducción saltatoria) y es conducido electrotonicamente a lo largo del internodo. La ultraestructura del axón, con sus neurotúbulos y mitocondrias, está probablemente relacionada con la función trófica de la fibra nerviosa, que asegura el crecimiento continuo del axón y la síntesis de material a nivel de la terminación nerviosa. Se destacan las propiedades biosintéticas del pericarion y los problemas del flujo axónico.

La transmisión sináptica puede ser eléctrica, pero con mayor frecuencia es de tipo químico y presupone un mecanismo neuroquímico tendiente a la producción de sustancias trasmisoras en la terminación nerviosa. Ambos tipos de transmisión cuentan con un sustrato morfológico. La presencia de sinapsis eléctricas coincide con uniones estrechas de las membranas. Las sinapsis químicas tienen una estructura más compleja, tanto en lo que respecta a las membranas como a las terminaciones en sí. El principal componente presináptico está representado por las vesículas sinápticas, que constituyen verdaderas unidades cuánticas del trasmisor. Con el microscopio electrónico es posible distinguir las sinapsis adrenérgicas y seguir los cambios inducidos por agentes farmacológicos que disminuyen o aumentan la cantidad de catecolaminas. Las técnicas de fraccionamiento celular permitieron aislar las terminaciones nerviosas y las vesículas sinápticas, con lo cual fue facilitado el análisis de los transmisores y enzimas relacionadas que ellas contienen. En términos generales, en las sinapsis químicas tiene lugar un proceso localizado de neurosecreción, que es similar a la producción de otros neurohumores. Se presentan brevemente los últimos trabajos llevados a cabo en materia de separación de membranas de terminaciones nerviosas, complejos unionales y proteínas receptoras.

El último capítulo trata de la secreción celular, proceso que se manifiesta activamente en muchas células. El estudio del ciclo secretor tiene gran interés puesto que implica la intervención coordinada de todos los componentes celulares, tanto en el tiempo como en el espacio. Este capítulo es una revisión de los diversos procesos y estructuras descritos en capítulos precedentes. Se podrá advertir que las técnicas de fraccionamiento celular, el empleo de sustancias radiactivas y la observación con el microscopio electrónico han propiciado el estudio integral de la síntesis de los productos de secreción y de su pasaje a través del sistema vacuolar, hasta su expulsión definitiva por la célula.

Las diversas etapas del ciclo secretor se cumplen en forma característica en las células pancreáticas y suprarrenales, que constituyen un ejemplo básico para su interpretación.

Permeabilidad celular, fagocitosis, pinocitosis y lisosomas

PERMEABILIDAD CELULAR

En el capítulo 9 se estudió a la membrana celular desde el punto de vista de su organización química y molecular. La mayor parte de nuestro conocimiento acerca de ella es indirecto y se basa en sus diferentes propiedades.

Aunque puede visualizarse con el microscopio electrónico, es muy delgada para que sea factible apreciar en detalle su organización molecular. En este capítulo consideraremos las múltiples propiedades que confieren a la membrana importancia en fisiología celular y que, en conjunto, reciben el nombre de *permeabilidad celular*.

La permeabilidad es fundamental para la fisiología de la célula y para el mantenimiento de condiciones fisiológicas intracelulares adecuadas pues condiciona la entrada de ciertas sustancias, muchas de las cuales son necesarias para mantener los procesos vitales y la síntesis de nuevas sustancias vivas, y regula la salida de agua y de productos de excreción, que deben ser eliminados de la célula.

La presencia de membrana establece una clara diferencia entre el *líquido intracelular* y el *extracelular*, en el cual la célula está inmersa. En los organismos unicelulares que crecen en las lagunas o en el mar, el líquido extracelular es el agua dulce o la salada, respectivamente. En los organismos multicelulares existe un líquido interno representado por la sangre, la linfa y, en especial, el *líquido intersticial*, que se halla en contacto con la superficie externa de la membrana celular. Los intercambios se realizan a través de la membrana entre el líquido intersticial o extracelular y el que se encuentra dentro de la célula, es decir, el líquido intracelular.

Presión osmótica y soluciones fisiológicas

Una de las funciones de la membrana celular consiste en mantener en equilibrio la presión osmótica del líquido intracelular con la del líquido intersticial. Cuando las células vegetales son colocadas en una solución cuya presión osmótica es similar a la del líquido intracelular (solución isotónica), el citoplasma permanece adherido a la pared celulósica y no se modifica. Si la solución del medio es más concentrada (solución hipertónica), la célula pierde agua y el citoplasma se separa de la pared celular rígida. Por el contrario, cuando la solución es menos concentrada (solución hipotónica), la célula se hincha y eventualmente estalla. Como la membrana plasmática es permeable al agua y a ciertos solutos, la presión osmótica se mantiene por un mecanismo que regula la concentración de las sustancias disueltas en el interior de las células.

A fines del siglo pasado, Hamburger demostró que el mantenimiento de la presión osmótica desempeña un papel importante en la vida de la célula, comprobando que la membrana celular se comporta como una membrana osmótica, y que una solución de cloruro de sodio al 0,9 por ciento conserva intactos a los eritrocitos. En soluciones menos concentradas éstos se hemolizan, y en un medio de mayor concentración se retraen por pérdida de agua. Dichos experimentos son aplicables a todas las células animales.

Desde el punto de vista biológico, las soluciones se pueden agrupar en tres clases: 1) *Soluciones isotónicas*, que tienen la misma presión osmótica que la de las células; por ejemplo, las soluciones 0,3 M de no electrolitos son isotónicas en relación con las células de mamíferos. 2) *Soluciones hipotónicas*, cu-

ya presión osmótica es menor que la de las células; una solución de cloruro de sodio al 0,66 por ciento, isotónica para los eritrocitos de anfibios, es hipotónica con respecto a las células de mamíferos. 3) *Soluciones hipertónicas*, de mayor presión osmótica que la de las células.

Como consecuencia de estos hallazgos fueron adoptadas las *soluciones fisiológicas* que poseen la misma presión osmótica de la sangre de los animales y una concentración equilibrada de los diversos iones (por ejemplo, soluciones de Ringer y Tyrode).

En un organismo superior, la regulación de la presión osmótica tiene lugar principalmente a nivel de los riñones, y la presión osmótica del líquido intersticial es casi igual a la del líquido intracelular.

En los vegetales hay una presión osmótica mayor en el líquido intracelular, pero la célula no estalla por la presencia de una pared celulósica rígida. En general, la presión osmótica en estas células es de alrededor de 10 atmósferas, si bien en algunos casos, como en *Penicillium*, puede alcanzar el grado extremo de 100 atmósferas. Las células animales carecen comúnmente de la turgencia que caracteriza a las células vegetales, aunque existen excepciones, como la *Tubularia*. Por el contrario, los huevos no fecundados de algunos animales marinos, el erizo de mar entre ellos, se comportan como verdaderos osmómetros. Puesto que son esféricos, al medir el diámetro, se puede determinar el volumen inicial y los cambios que éste experimenta en relación con las variaciones de la presión osmótica del medio. En muchas bacterias ocurre algo semejante. Es posible, por tanto, calcular la presión osmótica interna, estableciendo aquella concentración que no ocasiona cambios de volumen.¹

En diversos organismos unicelulares el equilibrio osmótico se mantiene por medio de una vacuola contráctil. Se trata de un "organoide" que extrae el agua del protoplasma y al contraerse expulsa su contenido hacia el medio externo. Los protozoarios que carecen de vacuolas contráctiles, eliminan el agua excedente a través de la membrana celular.

Concentración iónica y potenciales eléctricos de las membranas

En todas las células existe: a) una diferencia entre su concentración iónica y la del medio extracelular, b) un potencial eléctrico

a través de la membrana. Estas dos propiedades se encuentran íntimamente relacionadas, ya que el potencial eléctrico depende de la distribución desigual de los iones a ambos lados de la membrana. Mediante el empleo de delgados microelectrodos, con una punta de 1 μ o menos, es factible penetrar a través de la membrana en el interior de la célula y también dentro del núcleo celular (figura 16-3), descubriéndose la existencia de un potencial eléctrico —también denominado potencial estable o de reposo—, que siempre es negativo. Los valores de este potencial varían entre -20 y -100 milivoltios (mV) en los diferentes tejidos.

Como demuestra la tabla 21-1, el líquido intersticial tiene una elevada concentración de Na^+ y Cl^- , y el líquido intracelular una alta concentración de iones K^+ y de aniones orgánicos (A^-).

TABLA 21-1. Concentración iónica y potencial estable en el músculo
(Según Woodbury,² modificado.)

Líquido intersticial		Líquido intracelular	
Cationes	Na	145	12
	K	4	155
Aniones	Cl	120	3,8
	COH_3	27	8
	A^- y otros	7	155
Potencial		0	-90mV

Difusión o permeabilidad pasiva

Cuando se mezclan dos soluciones de diferentes concentraciones en ausencia de una membrana que se interponga, ocurre un proceso que recibe el nombre de difusión. Si se coloca una solución concentrada de hidrato de carbono en contacto con agua, se producirá un movimiento (también denominado flujo: M) del soluto de la región de mayor concentración a la de menor concentración. En este caso, cuanto mayor es la diferencia entre las concentraciones de las dos soluciones (es decir, el gradiente de concentración), más rápida será la velocidad de difusión.

La presencia de una membrana lipoproteica como es la plasmática, modifica en gran parte esta difusión o permeabilidad pasiva. El pasaje a través de ella es muy lento por su escasa permeabilidad a los diferentes tipos de moléculas, constituyendo una barrera para la mayoría de ellas.

Ya Overton, a fines del siglo pasado, comprobó que las sustancias que se disuelven en los lípidos pasan con mayor facilidad al interior de la célula. Collander y Bärlund,³ en los clásicos experimentos con células de *Chara*, demostraron que la velocidad de penetración de las sustancias depende de su solubilidad en los lípidos y del tamaño molecular. Cuanto más solubles son, más rápidamente penetran, y a igual solubilidad en lípidos, las moléculas más pequeñas penetran con mayor velocidad (fig. 21-1).

Difusión de iones. La difusión de iones a través de las membranas plantea problemas difíciles, puesto que no sólo depende del *gradiente de concentración*, sino también del *gradiente eléctrico* presente en el sistema.

Dentro de la célula existe una gran concentración de aniones que, debido a su tamaño, no pueden difundirse libremente a través de la membrana. En estas condiciones, los cationes y aniones difusibles alcanzan un equilibrio en el cual los iones positivos están más concentrados en el interior de la célula que fuera de ella, mientras que para los iones negativos ocurre lo contrario. En 1911, Donnan afirmó que si una célula hipotética con una carga interior negativa no difusible se coloca en una solución de KCl, el K⁺ será arrastrado a su interior por los gradientes de concentración y eléctricos, en tanto que el Cl⁻ lo será sólo por el gradiente de concentración, siendo expulsado por gradiente eléctrico. Como demostró Donnan, las concentraciones de equilibrio son exactamente recíprocas:

$$\frac{[K^+ \text{ interno}]}{[K^+ \text{ externo}]} = \frac{[Cl^- \text{ externo}]}{[Cl^- \text{ interno}]} \quad (1)$$

El equilibrio Donnan, que implica únicamente fuerza física (es decir, sin gasto de energía por parte de la membrana), fue confirmado en la mayor parte de las células, al demostrarse que el potencial de membrana es negativo dentro de ellas y se acompaña de altas concentraciones de K⁺ y bajas concentraciones de Cl⁻ (fig. 21-3, A y B). En forma simplificada (para iones monovalentes a 20°C), la relación entre el gradiente de concentración y el potencial

de membranas de reposo está dado por la ecuación de Nernst:

$$E = 58 \log \frac{C_1}{C_2} \quad (2)$$

donde E se expresa en mV.

Teniendo en cuenta las ecuaciones (1) y (2), el equilibrio Donnan para el ClK puede representarse de la siguiente manera:

$$E = 58 \log \frac{[K^+ \text{ interno}]}{[K^+ \text{ externo}]} = 58 \log \frac{[Cl^- \text{ externo}]}{[Cl^- \text{ interno}]} \quad (3)$$

De acuerdo con (3), una elevación en el potencial de membrana aumentará al mismo tiempo la asimetría iónica a través de aquella, y viceversa. Aun cuando las primeras mediciones de potenciales de membrana y de concentraciones iónicas parecieron confirmar este tipo de *equilibrio de difusión o pasivo*, determinaciones más precisas en diversos especímenes celulares han demostrado su inexactitud. Por ejemplo en eritrocitos de mamíferos la relación:

$$\frac{K^+ \text{ interno}}{K^+ \text{ externo}} = \frac{Cl^- \text{ interno}}{Cl^- \text{ externo}} \quad (4)$$

es de 15 en lugar de 1 (como lo indicaría el equilibrio Donnan). Esta discrepancia puede explicarse por la existencia de un transporte activo de iones.

Permeabilidad celular y transporte activo

Además de la difusión o pasaje pasivo de moléculas y iones a través de las membranas, la permeabilidad comprende una serie de mecanismos que implican consumo de ener-

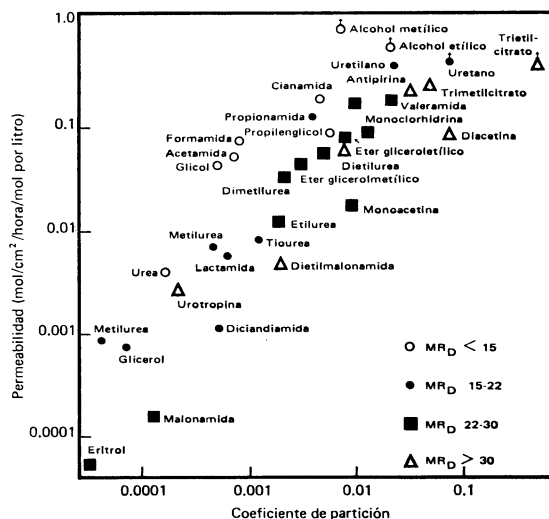


FIG. 21-1. Velocidad de penetración (permeabilidad) en células de *Chara ceratophylla*, en relación con el volumen molecular (expresado como refracción molecular MRD) y con la distribución de aceite y agua (coeficiente de partición). (De Collander y Bärlund.)

gía y a los que se denomina transporte activo, indicando que debe emplearse cierta cantidad de trabajo para que puedan penetrar las moléculas o iones. El adenosintrifosfato (ATP), producido sobre todo en las mitocondrias por medio de la fosforilación oxidativa, se emplea generalmente como fuente de energía (véase cap. 11). Debido a ello, el transporte activo está relacionado con la respiración celular. Siempre que una molécula deba ser trasladada en contra de un gradiente de concentración, existe transporte activo.

En la figura 21-2, el transporte activo es explicado por analogía mediante un ejemplo de hidrostática, en el cual el agua ha de desplazarse en contra de la corriente (contra la gravedad). El trabajo osmótico resultante se expresa por la ecuación de Nernst (donde R es la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta). En el caso de una molécula cargada eléctricamente, el pasaje a través de un gradiente electroquímico puede también implicar un gasto de energía.

Por ejemplo, para mantener una baja concentración de Na^+ en su interior, la célula debe expulsarlo en contra de un gradiente (es decir, mayor cantidad de Na^+ en el exterior) y, además, en contra de una barrera electroquímica, puesto que la membrana es negativa por dentro y positiva por fuera (figura 21-2, A y B).

Propiedades del transporte activo

Con el objeto de comprender mejor el criterio sustentado para determinar si una sustancia atraviesa la membrana celular por transporte activo, tomaremos como ejemplo al riñón. Si son sumergidos túbulos renales aislados en una solución de rojo fenol, después de cierto período el colorante pasa a través de las células y se concentra en la luz de los túbulos (fig. 21-3).

Se trata de un transporte activo, y ello se demuestra por el hecho de que la concentración interna es mucho más alta que la solución original que baña el túbulo. Por tanto, las células están eliminando o secretando el colorante en contra de un gradiente de concentración. Otros experimentos pusieron de manifiesto que el transporte activo depende de la energía producida por la célula; así, enfriando el tejido con hielo (en otras palabras, bloqueando el metabolismo celular) no se observa concentración del colorante; lo mismo ocurre con el empleo de ciertos venenos metabólicos que inhiben la respiración celular (cianuro, azida).

El trabajo realizado por las células en contra de un gradiente de concentración se deduce de la ecuación de la figura 21-2, en la cual C_1 es la concentración del colorante en el interior, y C_2 la concentración externa.

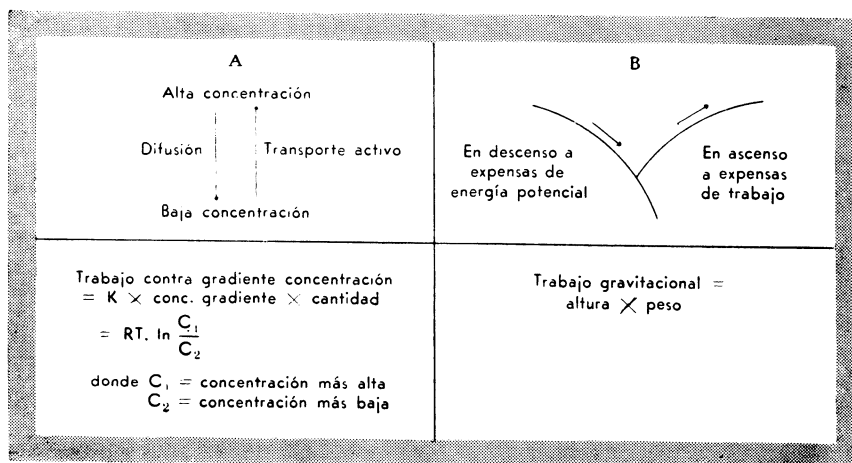


FIG. 21-2. Analogía entre el gradiente de concentración (mitad superior de A) y el gradiente de potencial (mitad superior de B), y entre el movimiento en contra de un gradiente de concentración (mitad inferior de A) y el trabajo realizado en contra de la gravedad (mitad inferior de B). Al pie de la figura se dan las ecuaciones de trabajo en contra de un gradiente de concentración (trabajo osmótico) y del trabajo para levantar un peso hasta cierta altura. (De A. C. Giese.)

Trasporte activo de iones y potencial de membrana

El transporte de iones en contra de un gradiente electroquímico requiere un consumo suplementario de oxígeno. Se calcula que el 10 por ciento del metabolismo de reposo de un músculo de rana es utilizado para el transporte de iones de sodio.

Este consumo puede aumentar al 50 por ciento en algunas condiciones experimenta-

les, en las cuales es estimulada la secreción de sodio por el músculo.

Puede demostrarse, tanto en células animales como vegetales, que el potencial de membrana de reposo se debe al transporte activo recurriendo a su bloqueo metabólico por anoxia o venenos específicos. Ello es particularmente evidente cuando se combinan la anoxia con el envenenamiento de la glucólisis.⁴ Como sugirió Krogh, en 1946, el potencial de membrana se encuentra en un estado de equilibrio

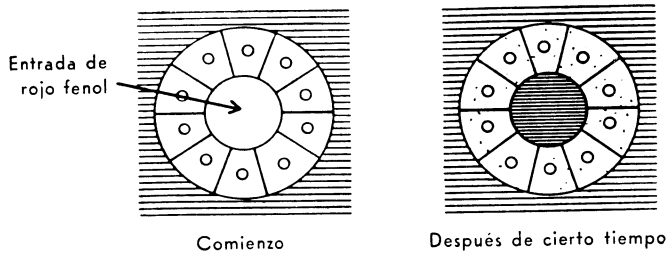


FIG. 21-3. Acumulación del rojo fenol en cortes de túbulo proximal del riñón de embrión de pollo (esquemático). El colorante penetra hasta que se concentra más en el interior de la luz del túbulo que en el exterior. (De A. C. Giese.)

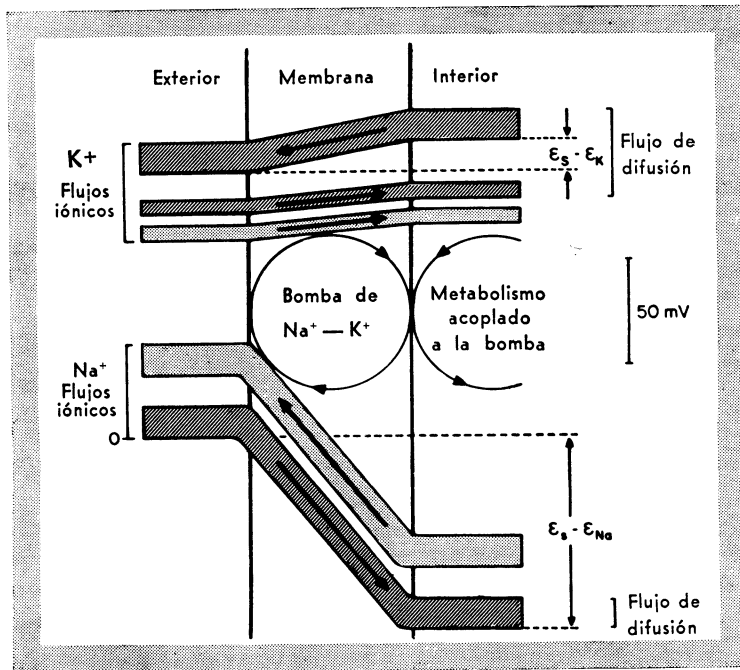


FIG. 21-4. Flujos activo y pasivo de Na^+ y K^+ a través de la membrana. En la ordenada se indican los potenciales electroquímicos de los iones ($E_s - E_K$ para K^+ y $E_s - E_{\text{Na}}$ para el Na^+), y en la abscisa la distancia cerca de la membrana. El espesor de la banda representa la intensidad del flujo particular en una dirección. Los flujos pasivos (cuesta abajo) y activos (cuesta arriba) se distinguen por el sombreado de las bandas. La difusión pasiva del Na^+ es despreciable y no está indicada. (De J. C. Eccles.)

dinámico, que supone un gasto constante de energía.

Un ejemplo ilustrativo de este tipo de transporte lo proporciona la piel aislada de rana. El epitelio se especializa en el transporte de Na^+ del agua de la laguna al líquido intersticial. Por medio de dicho mecanismo la rana toma del medio este importante ión para su empleo en los diversos tejidos. La piel aislada permanece viva durante muchas horas y es susceptible de ser colocada como un diafragma entre dos cámaras, en las cuales se modifica experimentalmente la concentración iónica y otros factores.⁵ En esta preparación fue posible verificar que existe una diferencia de potencial a través de la piel, siendo la superficie interior positiva respecto de la exterior. Los iones de sodio son transportados desde la superficie externa hacia la interna, y puede probarse que la corriente establecida entre ambas es causada por el flujo de sodio. También se comprueba que la hormona antidiurética de la neurohipófisis estimula el transporte de sodio y de agua. Hallazgos similares se obtuvieron en otras membranas complejas, como la vejiga de sapo aislada⁶ y los túbulos renales del *Necturus*.⁷

El transporte iónico es particularmente intenso en las células secretoras como las de

las glándulas salivales y sudoríparas y, sobre todo, de las glándulas del estómago, que producen grandes cantidades de iones H^+ y Cl^- que deben ser reemplazados por la sangre. La transferencia iónica resulta verdaderamente extraordinaria en las glándulas secretoras de sales de ciertas aves marinas (por ejemplo, el albatros) que beben agua salada.

El transporte activo de iones es fundamental en el mantenimiento del equilibrio osmótico de las células y de la concentración necesaria de aniones, cationes y de iones específicos para el funcionamiento celular (tabla 21-1). Los iones son indispensables en gran número de reacciones enzimáticas y también para regular el intercambio de moléculas de agua entre la célula y el medio que la rodea. Junto con la eliminación de Na^+ , "bombeado" continuamente por la célula, hay salida de moléculas de agua. De este modo, la célula puede mantener constante su presión osmótica a pesar de las numerosas moléculas grandes que constituyen el protoplasma y que no pueden ser intercambiadas con el medio.

Los iones de potasio, concentrados en el interior de la célula (tabla 21-1), deben pasar en contra de un gradiente de concentración. Esto puede llevarse a cabo por medio

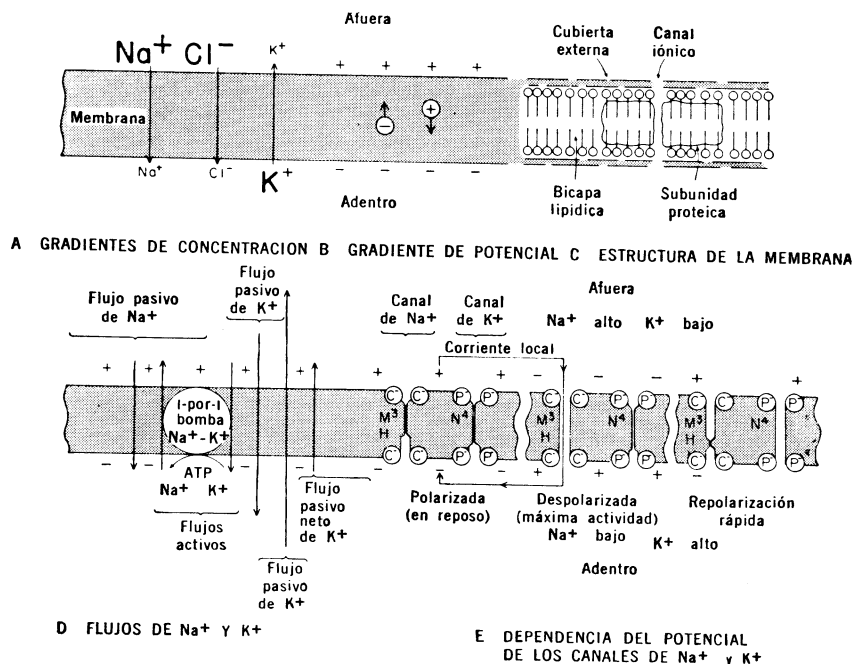


FIG 21-5. Esquemas que interpretan a la membrana plasmática desde el punto de vista de su estructura, los gradientes y flujos iónicos, así como la influencia que éstos tienen en los potenciales (ver descripción en el texto). (Cortesía de J. W. Woodbury.)

de un mecanismo de "bombeo" y con gasto de energía. Como fuera explicado con anterioridad, el transporte de Na^+ es susceptible de producirse en virtud de un proceso activo, denominado algunas veces "bomba de sodio". Como existen amplias evidencias de que otros iones son transportados por un mecanismo similar, en términos generales se habla de "bombeo iónico".

El esquema de la figura 21-4 resume las relaciones que existen entre la transferencia de K^+ y Na^+ (es decir, flujos iónicos) por mecanismos pasivos y activos, y el potencial de reposo resultante. Los flujos pasivos (cuesta abajo) se distinguen de los activos (cuesta arriba) por medio del sombreado de las bandas. Puede advertirse que el bombeo activo de Na^+ fuera de células es el principal mecanismo para mantener un potencial negativo intracelular de -50 mV .^{2, 8}

Observando la figura se evidencia que la distribución de iones a través de la membrana depende de dos factores distintos: 1) fuerzas de difusión electroquímica, que tienden a establecer un equilibrio Donnan (transporte pasivo), y 2) procesos de transporte iónico que implican gasto de energía (transporte activo).

En la figura 21-5, D, los flujos activo y pasivo para el Na^+ y el K^+ se representan en forma esquemática. La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ desplaza iones en la proporción 1:1, expeliendo Na^+ y tomando K^+ (flujos activos). Al mismo tiempo, el flujo pasivo de Na^+ depende de una gran fuerza impulsora (FI), resultante de los gradientes de concentración y voltaje, y de la pequeña permeabilidad de la membrana al Na^+ (P_{Na^+}).

El flujo pasivo de K^+ resulta, a su vez, de una pequeña fuerza impulsora y de una gran permeabilidad al K^+ (P_{K^+}) (más adelante se mencionará la causa por la cual el Na^+ pasa más dificultosamente que el K^+ a través de la membrana).

Mecanismo de transporte iónico.

Poros de la membrana celular

En la actualidad es posible afirmar que la maquinaria molecular comprendida en el transporte iónico se localiza en la membrana plasmática. La demostración se efectuó en dos tipos de estructuras particularmente favorables.

a) Los glóbulos rojos hemolizados, en los que sólo queda la membrana celular, pueden llenarse nuevamente con soluciones apropiadas que contienen iones y ATP; en estas condiciones, se aprecia el transporte de Na^+ y la incorporación de K^+ , como ocurre en una célula normal.

b) El axón gigante del calamar, que mide

alrededor de 0,5 mm de diámetro puede ser vaciado del axoplasma y luego llenarse con soluciones de diferentes electrólitos. Con esta preparación, en la cual falta la mayor parte del axoplasma y sólo subsiste la membrana excitable, se obtiene el transporte de iones en contra de un gradiente de concentración, potenciales permanentes y, aun, potenciales de acción y conducción de impulsos nerviosos.⁹

El empleo de radioisótopos demuestra que los iones pueden penetrar rápidamente dentro de la célula sin producir efectos osmóticos manifiestos,⁹ suponiéndose que pasan de una parte a otra de la membrana a través de poros cargados eléctricamente.

La figura 21-5, C y E constituye una posible interpretación a nivel molecular de los poros de la membrana. En ésta se advierte la presencia de subunidades proteicas sumergidas. El poro puede concebirse como el intersticio entre cuatro subunidades proteicas adyacentes, que formarían un canal hidrofílico a través de la membrana (dos de esas subunidades se representan en C).¹⁰

En E, los canales iónicos para el Na^+ y el K^+ aparecen en la condición polarizada o de reposo, o en el estado de despolarización que tiene lugar durante el potencial de acción (véase cap. 24). Se cree que dichos canales están cerrados en la membrana en reposo, polarizada. La selectividad del poro de Na^+ se debería a grupos carboxilo (C^-) que protegen las entradas del poro (cargas fijas). En el caso de los poros del K^+ , la carga fija negativa la proporcionarían los grupos fosfato (P^-). El resto del esquema pone de manifiesto la apertura de los poros de Na^+ en el pico de despolarización del potencial de acción y la apertura de los poros de K^+ durante la repolarización (véase cap. 24).

La teoría de la existencia de poros en la membrana fue confirmada en los últimos años por el estudio de la penetración de moléculas desprovistas de carga eléctrica, que son insolubles en la fase lipídica (urea, formamida, glicerol). La velocidad de pasaje de estas sustancias se halla relacionada con el tamaño de la molécula ocupada por los poros de la membrana. En membranas biológicas diferentes se ha calculado que el radio del poro varía entre 8 y 3,5 Å (fig. 21-6).

El área total de los poros en los glóbulos rojos es del orden de 0,66 por ciento de la superficie. Ello significa que un poro de 7 Å estaría rodeado de un cuadro no poroso de

200 $\times$ 200 Å. Estos hallazgos indican que la célula emplea sólo una pequeña fracción de su superficie para el intercambio iónico.¹¹

Sistemas de permeasa

La existencia de poros pequeños en la membrana celular impediría la penetración de algunas moléculas esenciales. Para incorporarlas, la membrana debe desarrollar un sistema de transporte químico específico.

En el capítulo 19 se describió el denominado *sistema de permeasa para la β -galactosidasa*, que se encuentra en la *E. coli* e induce la penetración de esa sustancia en la bacteria. Este sistema de permeasa, que está determinado genéticamente, es una proteína de membrana específica especializada en el transporte y localizada en la membrana celular. Dicha proteína ha sido marcada y parcialmente purificada. El pasaje de aminoácidos podría estar también controlado por permeasas especiales. Se piensa que la *E. coli* tiene entre 30 y 60 sistemas especializados en el transporte de moléculas diferentes.¹³

Penetración de moléculas más grandes

Lo expresado hasta aquí demuestra que con el nombre genérico de permeabilidad celular se comprende una serie de mecanismos diferentes, algunos de los cuales son conocidos y otros deben ser todavía dilucidados. Además de la solubilidad en lípidos, que permite la entrada de ciertas sustancias ajenas al organismo (por ejemplo anestésicos), otras moléculas y iones penetran generalmente a través de poros dotados de carga eléctrica y mediante sistemas de permeasas.

No existe ninguna duda de que, en determinadas condiciones, moléculas más grandes, como ciertas proteínas, pueden penetrar en la célula. Este es el caso de la ribonucleasa, que lo hace fácilmente en las células vegetales vivas y también en huevos, flagelados, tumores ascíticos, etcétera (Brachet, 1957). Asimismo, se ha observado el pasaje de proteínas básicas del tipo de la protamina y de la histona.¹⁴ En el capítulo 18 se mencionó que el ADN puede penetrar en ciertas bacterias y

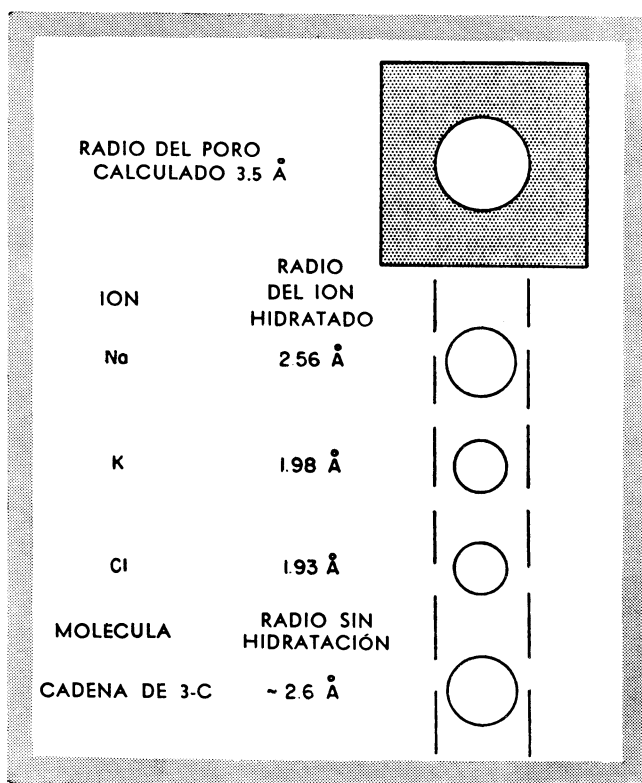


FIG. 21-6. Representación esquemática del poro de un glóbulo rojo. Obsérvese que el radio de ión hidratado es mayor para el Na^+ que para K^+ (De A. K. Solomon.)

producir un cambio genético conocido como *transformación*.

Más adelante se describirán los procesos de fagocitosis y de pinocitosis, por medio de los cuales las células ingieren en masa materiales sólidos o líquidos.

Mecanismo de transporte activo.

Importancia de las ATPasas

Se han formulado diversas hipótesis para explicar el mecanismo de transporte activo a través de las membranas.^{15, 16} Un punto importante se refiere al acoplamiento del metabolismo celular con el transporte de iones y otras moléculas. En el capítulo 11, hicimos referencia al problema de la hinchazón y contracción de las mitocondrias, en relación con el mecanismo de la fosforilación oxidativa. En este caso, es evidente que los factores que inhiben el acoplamiento (por ejemplo, dinitrofenol, tiroxina), producen la entrada de agua y iones en la mitocondria, mientras que el ATP ejerce el efecto opuesto (figura 11-15).

La teoría básica del transporte activo implica la adhesión de la sustancia transportada a un componente que forma parte de la membrana. Puede tratarse de una proteína, de un lípido o, más probablemente, de una enzima que toma la sustancia y la trasfiere hacia el otro lado de la membrana, con la posibilidad de reanudar el proceso. Ésta ha sido llamada con frecuencia hipótesis del "transportador" (*carrier*), porque supone la existencia de una molécula transportadora capaz de formar un complejo con la sustancia.

Las observaciones precedentes acerca de los sistemas de permeasa, sugieren que la enzima situada en la membrana celular puede ser también el mecanismo de transporte.

Un paso importante en la identificación del mecanismo de transporte lo proporcionó el descubrimiento, en membranas de eritrocitos, de una ATPasa característica activada por Na^+ y K^+ ,¹⁷ la cual, además, presenta otras semejanzas con la bomba de Na^+ y K^+ . Una de las más notables es que el glucósido cardíaco *ouabaina* reduce la salida de Na^+ y ocasiona la hinchazón de la célula, al mismo tiempo que inhibe la ATPasa Na^+K^+ -activada. En membranas de eritrocitos se comprobó que la ATPasa es asimétrica.^{18, 19} Mitchell²⁰ propuso un modelo en el cual el transporte iónico es explicado por la disposición vectorial de la enzima dentro de la membrana (véase cap. 11). De acuerdo con el autor, la ATPasa cataliza la hidrólisis de ATP en el lado intracelular usando iones OH^- del interior y iones H^+ de la superficie externa. El resultado de esta actividad es una separación de cargas, que produce la acidificación del interior de la

membrana y la alcalinización de su lado externo. Evidencias citoquímicas de esta asimetría fueron proporcionadas por técnicas de microscopia electrónica realizadas con membranas de eritrocitos. El producto de la reacción de la ATPasa, que incluye la liberación de un fosfato, se localiza exclusivamente a lo largo de la superficie interna de la membrana.²¹

En la actualidad, se cree que el complejo ATP-ATPasa enzima-sustrato puede actuar como un verdadero mecanismo de transporte, ligando el Na^+ interno y liberándolo en el exterior de la membrana. Un proceso similar pero inverso es postulado para el K^+ . (Con respecto a este punto, véase "Biochemical aspects of Active Transport", R. W. Albers, 1967).

ENDOCITOSIS

En estrecha relación con la actividad de la membrana plasmática se encuentran la fagocitosis y la pinocitosis, por medio de las cuales la célula incorpora materiales sólidos y líquidos. Con la introducción del microscopio electrónico quedó demostrado que los fenómenos activos de penetración de sólidos y líquidos están más difundidos de lo que antes se pensaba.

La similitud entre ambos procesos ha llevado a emplear el término *endocitosis*, con el que se incluye tanto a uno como a otro. Mediante la *exocitosis*, en cambio, los productos envueltos en membranas son liberados a través de la membrana plasmática.

Este tipo de transporte es menos común que la permeabilidad activa o pasiva, puesto que sólo se observa en determinadas células y, en algunas de ellas, únicamente en ciertos períodos de su ciclo vital. Como se verá más adelante, no reemplaza, sino que complementa a los otros tipos de permeabilidad más habitualmente utilizados por la célula.

El problema del ingreso masivo de sólidos y líquidos es conexo con el de la formación de vacuolas y gránulos dentro de la célula, y con el fenómeno más general de *defensa* y *eliminación* del material ingerido por aquélla. También se asocia con la aparición de una partícula especial rica en enzimas hidrolíticas, que ha sido denominada *lisosoma*. Por esta causa, los lisosomas y los *microcuerpos* (*peroxisomas*) con él vinculados serán descritos en este capítulo y no junto con los orgánulos celulares, como se hace habitualmente.

Fagocitosis

La mayoría de las células, sean libres o formando parte de un tejido, reciben su alimento en estado de solución. En los metazoos

rios superiores, las sustancias son digeridas por enzimas en el interior del tubo digestivo y, después de la absorción, pasan a los líquidos orgánicos en dimensiones moleculares. El pasaje de estas moléculas a través de la membrana plasmática no puede ser advertido con el microscopio óptico, y fue considerado en párrafos anteriores a propósito del fenómeno más general de permeabilidad pasiva y activa. Sin embargo, en algunos casos la célula ingiere activamente partículas sólidas voluminosas y el proceso de penetración es visible con el microscopio óptico.

Esta actividad, llamada *fagocitosis* (del griego: *phagein*, comer), se encuentra en gran número de protozoarios y en ciertas células de metazoarios. Sin embargo, en estos últimos, más que un fenómeno de nutrición celular, constituye un medio de defensa, en cuanto implica la ingestión de partículas extrañas al organismo, como bacterias, polvo atmosférico y diversos coloides.

En los mamíferos, la fagocitosis se halla muy desarrollada en los leucocitos granulares de la sangre y también en células de origen mesoblástico, que suelen agruparse con la denominación genérica de *sistema macrofágico* o *reticuloendotelial*. Los elementos que pertenecen a este grupo incluyen los histiocitos del tejido conectivo, las células reticulares de los órganos hemopoyéticos (médula ósea, ganglios, linfático y bazo) y las que revisten los capilares sinusoides del hígado, glándula suprarrenal e hipófisis. Todas ellas son capaces de ingerir no sólo bacterias, protozoarios y restos celulares, sino también partículas más pequeñas de naturaleza coloidal. En este caso la fagocitosis recibe el nombre de *ultra-fagocitosis* o *coloidopexia*. Cuando el coloide absorbido es un cromógeno, se habla específicamente de *cromopexia*. Un ejemplo de cromopexia es la propiedad que tienen las células mesoblásticas de ingerir y acumular colorantes vitales de naturaleza coloidal.

En los protozoarios, la fagocitosis está íntimamente ligada al movimiento ameboide. Las amebas ingieren partículas voluminosas, incluso microorganismos, rodeándolas de pseudópodos hasta constituir una vacuola, dentro de la cual se produce la digestión del alimento. En los leucocitos y otras células fagocitarias, la fagocitosis puede no estar vinculada con el movimiento ameboide y efectuarse en células completamente inmóviles.

Al analizar el proceso de fagocitosis se distinguen dos fenómenos distintos. El primero

es de *adhesión* o *adsorción* de la partícula por la masa del protoplasma, y el segundo su *penetración* propiamente dicha en la célula. En algunas ocasiones ha sido posible disociar estas dos fases de la fagocitosis. Así, a baja temperatura, las bacterias pueden adherirse al citoplasma de los leucocitos sin ser ingeridas. Esta clase de adsorción, que es comparable a un proceso de aglutinación, parece obedecer a factores fisicoquímicos, como las cargas electrostáticas superficiales. La ingestión de la partícula puede ser considerada como el resultado de la extensión del citoplasma superficial o ectoplasma sobre la interfase. Por ejemplo, los macrófagos envían pseudópodos lamelares hialinos de 0,25 μ de espesor, que se adhieren y se extienden sobre la superficie de la partícula hasta rodearla por completo. Este fenómeno es similar al que se produce cuando un líquido “moja” y se extiende sobre una superficie sólida.

Los macrófagos acumulan los colorantes vitales ácidos como el azul pirrol, azul tripano y carmín de litio, y sustancias coloidales electronegativas como la plata, el sacarato de hierro y la tinta china.

Los colorantes vitales ácidos tienen un tamaño muy pequeño y, en consecuencia, gran poder de difusión. Sin embargo, para ser ultrafagocitados deben unirse previamente a una proteína que actúa como “vector”. Si se inyecta a un animal un colorante vital ácido o un coloide electronegativo, todas las células del sistema macrofágico lo acumulan en forma progresiva. Las sustancias se depositan primero en gránulos muy pequeños, que luego aumentan de tamaño hasta constituir verdaderos precipitados intracelulares. La característica fundamental de este sistema es que acopia y concentra los colorantes y coloides aun cuando sean administrados en soluciones muy diluidas. Con inyecciones masivas, otras células no pertenecientes al sistema pueden también ingerir esas sustancias.

Pinocitosis

Además de la ingestión de partículas sólidas, se ha observado la incorporación de vesículas líquidas por parte de la célula viviente. Este proceso, revelado primero por Edwards en amebas y por Lewis²² en células cultivadas, fue denominado *pinocitosis* (del griego: *beber*). Como puede verse fácilmente en las películas cinematográficas de Lewis, la ingestión de líquidos se acompaña de un vigoroso

movimiento del borde celular, como si las vesículas fuesen rodeadas y englobadas por pliegues del citoplasma. Las vacuolas capturadas en la periferia de la célula son transportadas a otras partes de ella, a varios micrones de distancia.

La posibilidad de que la pinocitosis pudiera estar relacionada en las amebas con la penetración de proteínas fue sugerida por primera vez, en 1934, por Mast y Doyle, y luego confirmada plenamente mediante el empleo de proteínas marcadas con fluoresceína y observando el proceso por intermedio del microscopio de fluorescencia²³ (véase cap. 7). La presencia de la proteína parece actuar como un estímulo para la pinocitosis. Su ingestión puede ser sorprendentemente elevada: durante el "período de alimentación", la ameba incorpora aproximadamente un tercio de su volumen de la solución proteica. Este material es luego eliminado en un período de 5 a 6 días. El organismo prácticamente "bebe" la solución de proteína y junto con ella puede absorber otras sustancias que normalmente no penetran. La glucosa-C¹⁴, por ejemplo, penetra en cantidades considerables si se la disuelve en una solución de proteína.²⁴

Por medio de experimentos sencillos se puede demostrar que la pinocitosis es inducida por ciertas sustancias. Puesta una ameba en agua, no hay pinocitosis, y tampoco se produce agregando hidratos de carbono; pero si se añaden algunos aminoácidos, proteínas y iones, es posible ver que la pinocitosis empieza con la formación de pequeños pseudópodos y canales tortuosos, que penetran y se desintegran en vacuolas o gránulos en el extremo interno. Finalmente, estas vacuolas, junto con las sustancias contenidas, pueden incorporarse al citoplasma.

La actividad pinocítica, una vez que se inicia por acción de la sustancia inductora, persiste alrededor de 30 minutos, durante los cuales se forman unos cien canales. Después, el proceso se detiene y la ameba debe esperar dos o tres horas antes que comience otro ciclo pinocítico. Esto es interpretado como un indicio de que la superficie disponible de la membrana para la invaginación se agota en ese período de 30 minutos.

Puede demostrarse que la pinocitosis y la fagocitosis son fenómenos esencialmente similares permitiendo, en primer término, que la ameba fagocite algunos ciliados y luego induciendo la pinocitosis. En estas condicio-

nes, el número de canales formados es mucho menor. Con el experimento inverso se comprueba que la ameba ingiere un número muy inferior de ciliados para alimentarse.

Cuando se inyectan en ratas partículas cuyo tamaño varía entre el de un eritrocito y el de la peroxidasa del rábano silvestre, aquellas se acumulan y se excretan con la misma velocidad. La peroxidasa constituye un excelente marcador para microscopía electrónica; con ella es dable observar que la adsorción de la partícula por la membrana representa el primer paso en el proceso de englobamiento. La destrucción de la enzima tiene lugar dentro de los lisosomas de las células de Kupffer y su vida media es de 6 horas.²⁵

Cubiertas externas y pinocitosis

En el capítulo 9 mencionamos la importancia de las cubiertas externas superpuestas a la membrana celular. Empleando una proteína fluorescente se observa que, inmediatamente después de la inmersión, la superficie de la ameba se cubre de una gruesa capa de proteína en la cual la concentración puede aumentar 50 o más veces; luego la membrana impregnada con la proteína se invagina.^{26, 27}

Si se realizan experimentos similares con sustancias opacas a los electrones, como las moléculas de ferritina o una suspensión de óxido de torio, en la primera etapa de pinocitosis, la concentración de las grandes moléculas se produce en el estrato de mucopolisacáridos que cubre la membrana plasmática de la ameba.²⁸

La unión de la proteína a la membrana explica por qué la absorción de aquella alcanza cifras tan considerables. De hecho, en un período de 5 minutos, una ameba puede incorporar una cantidad de proteína equivalente al 5 por ciento de su propio peso seco y a 50 veces su volumen en proteínas del medio en que se encuentra.^{29, 30} Usando hierro coloidal radiactivo, se analizó el mecanismo de su incorporación por parte de los macrófagos. En él se distingue: a) la fase de absorción reversible, que puede relacionarse con la concentración en el fluido extracelular, y b) el pasaje irreversible del oro ligado a la superficie hacia el interior de las células. La velocidad de ingestión es proporcional a la cantidad de oro adherido a la superficie celular. Se ha calculado que en estas células entre el 2 y el 20 por ciento de la superficie celular puede ser incorporada en un minuto.³¹

En la figura 21-7, A, se observa el plasmalema de una ameba con la membrana plasmática propiamente dicha y la cubierta ex-

terna, formada por filamentos de unos 60 Å de diámetro por 1000 a 2000 Å de longitud.

Después de agregar el material opaco a los electrones, éste se concentra intensamente en los filamentos (fig. 21-7, B).

Puesto que los mucopolisacáridos poseen una fuerte carga positiva, pueden unirse al inductor por atracción electrostática. En todos los casos, el inductor es una sustancia con carga eléctrica negativa, como iones, colorantes básicos o proteínas con un punto isoeléctrico ácido. En las amebas, el inductor puede causar un aumento de 50 veces en la resistencia eléctrica de la membrana, antes de la formación de los típicos canales.³²

Micropinocitosis

El empleo de la microscopia electrónica demuestra que la membrana plasmática de muchas células es susceptible de invaginarse formando pequeñas vesículas de unos 650 Å, y que este proceso podría estar relacionado con la pinocitosis, pero en un nivel submicroscópico. Esas vesículas fueron encontradas por vez primera en células endoteliales de capilares, en las cuales se concentran en regiones adyacentes a las membranas interna y externa. La presencia de vesículas que se abren en ambas superficies y de otras que atraviesan el citoplasma, sugiere el posible transporte de líquidos a través de las células. Un compo-

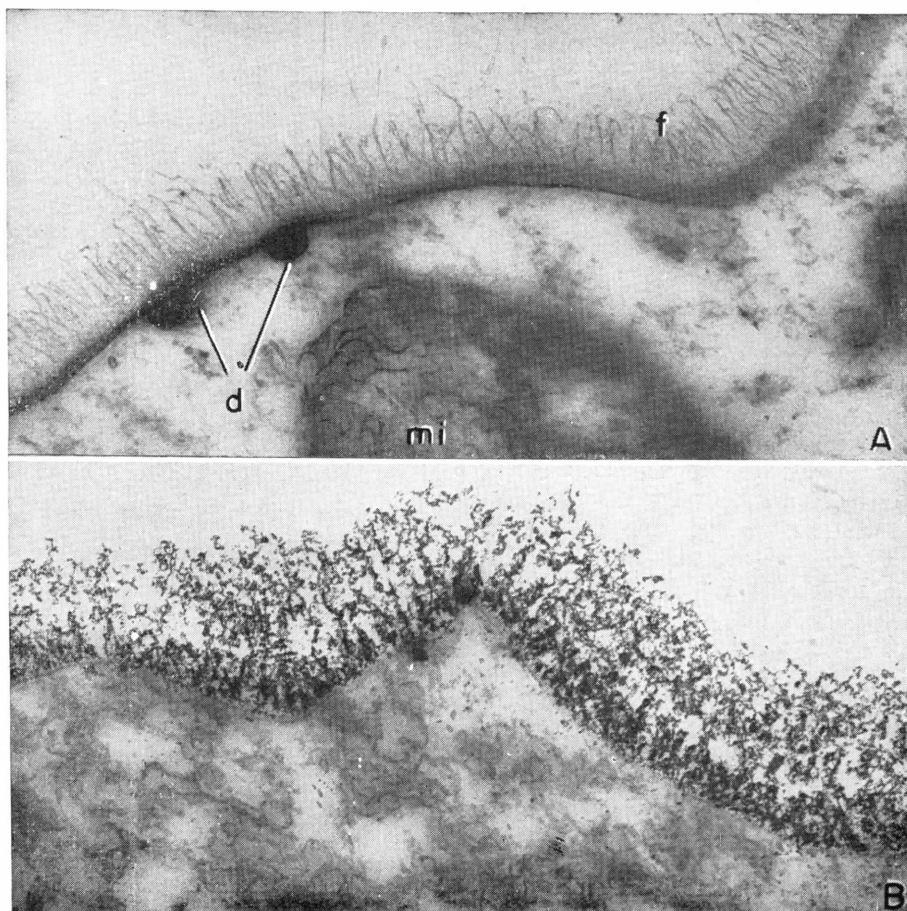


FIG. 21-7. A Fotomicrografía electrónica de la membrana celular de una ameba *Chaos chaos* mostrando la cubierta externa formada por finos filamentos de 50 a 80 Å de diámetro y 1000 a 2000 Å de longitud. f Filamentos; cm, membrana celular; mi, mitocondrias; d, cuerpo denso. 55,000 ×. B Lo mismo que A, pero después del agregado de partículas de dióxido de torio. Estas partículas se adhieren a los filamentos antes de la formación de canales y de la penetración del material dentro de la ameba. 38,000 ×. (Cortesía de P. W. Brandt y G. D. Pappas.)

nente semejante se halló en las células de Schwann y en las células satélites de los ganglios, así como en macrófagos, células musculares, células reticulares, etcétera.

El transporte de fluidos a través del endotelio capilar se supone que tiene lugar en cantidades cuánticas (Palade, 1958), e implica: la invaginación de la membrana plasmática,

la formación de una vesícula cerrada por fusión de la membrana, el movimiento de la vesícula a través del citoplasma endotelial, la fusión de la vesícula con la membrana plasmática opuesta y la descarga del contenido vesicular. Dicha secuencia fue corroborada por el hallazgo de estadios intermedios de contactos de membrana o de fusión de ellas,

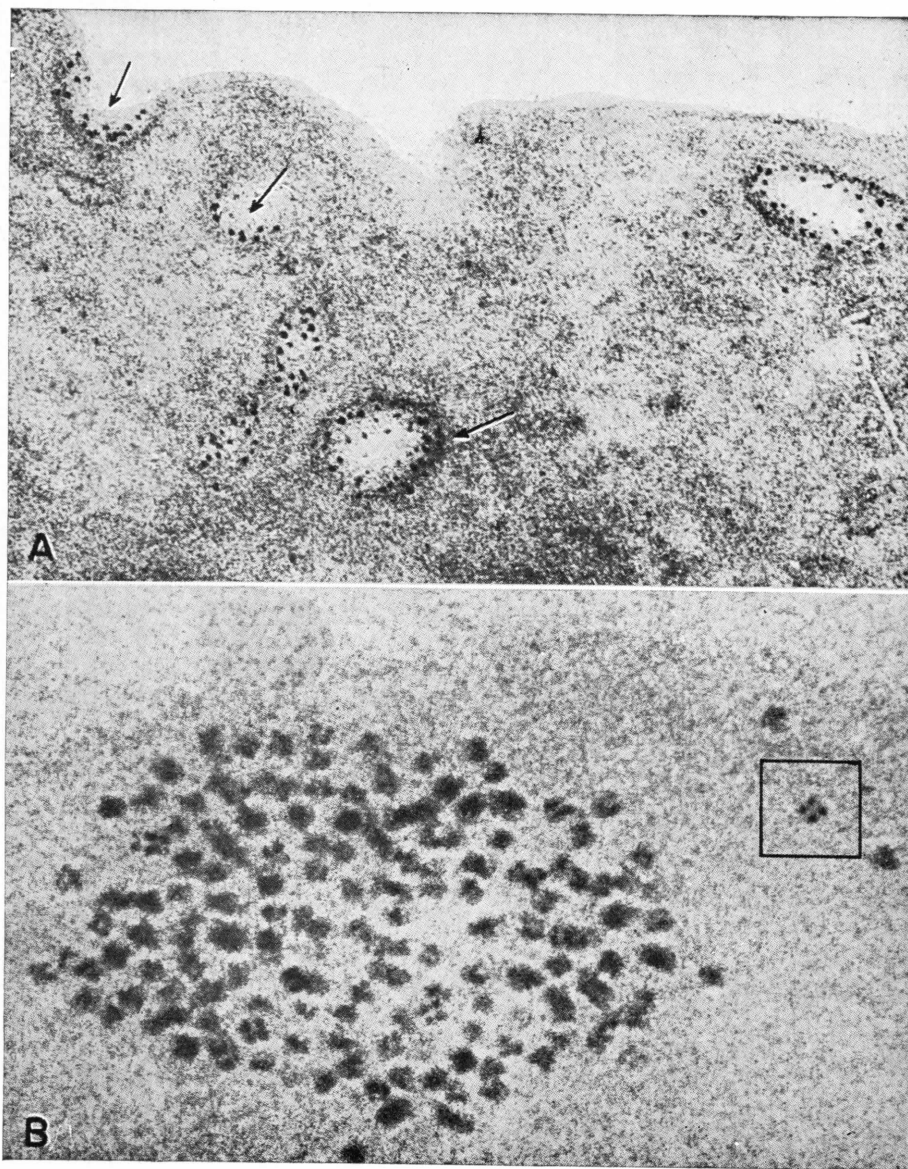


FIG. 21-8. A Fotomicrografía electrónica de la región periférica de un eritroblasto, en la que se advierte la penetración de moléculas de ferritina por micropinocitosis. Se indican con flechas diversas fases del proceso que comienza en la superficie celular. 180,000 $\times$. B Moléculas de ferritina en el interior del citoplasma de una célula reticular. Véase en el recuadro una molécula con cuatro puntos densos de unos 15 A, cada uno de los cuales contiene alrededor de 300 átomos de hierro. 850,000 $\times$. (Cortesía de M. Bessis.)

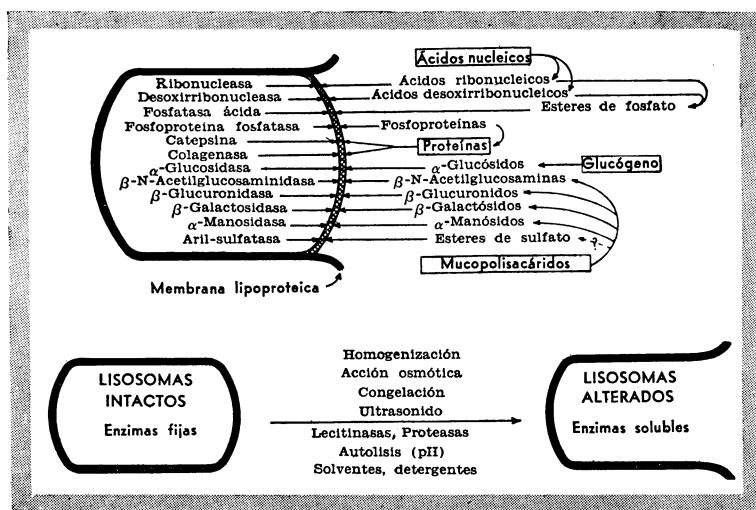


FIG. 21-9. Esquema que ilustra el concepto bioquímico del lisosoma. Este modelo se aplica principalmente a los lisosomas de hígado de rata. Arriba. Diferentes enzimas hidrolíticas y sustratos sobre los cuales ellas actúan. Abajo. Lisosoma intacto y el efecto de diversos agentes que rompen su membrana. (De C. de Duve.)

con progresiva eliminación de las capas de la estructura de la unidad de membrana (véase cap. 9).³³ El pasaje trasendotelial de fluidos también ha sido estudiado mediante la inyección de peroxidasa.³⁴

La médula ósea constituye un interesante ejemplo de la importancia fisiológica de la pinocitosis. En los denominados islotes eritroblásticos, donde se forman y maduran los glóbulos rojos, es posible observar células reticulares llenas con macromoléculas de ferritina que contienen hierro. El microscopio electrónico ha revelado que las moléculas abandonan las células reticulares y penetran en el eritroblasto, para ser usadas en la síntesis de hemoglobina, por un proceso muy similar a la pinocitosis³⁵ (fig. 21-8).

Este hallazgo pone de manifiesto la manera en que las células pueden utilizar una y otra vez el hierro proveniente de la destrucción de eritrocitos viejos, para formar nuevos glóbulos rojos.

Pinocitosis y transporte activo

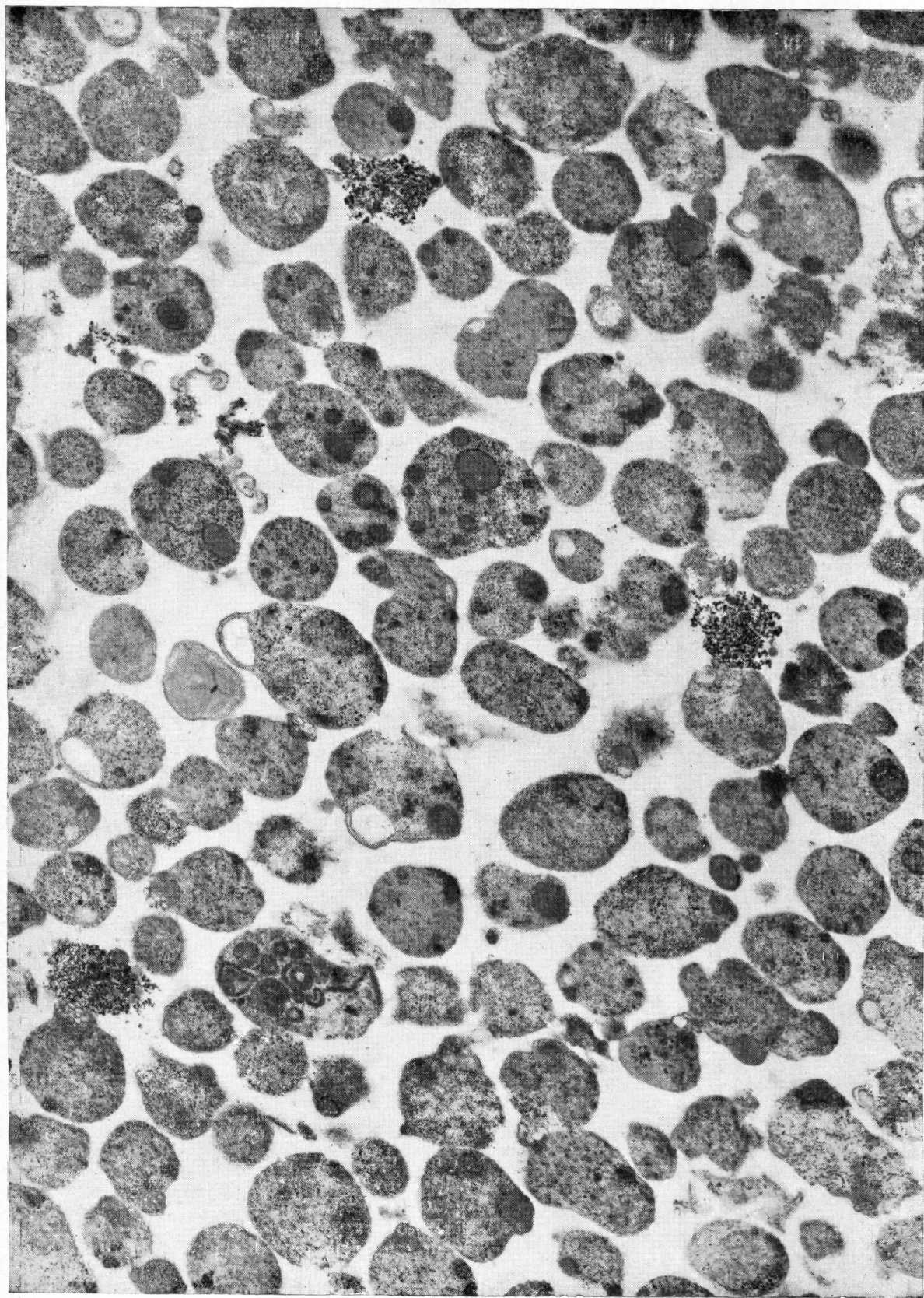
La fagocitosis y la pinocitosis son mecanismos activos, en el sentido de que la célula utiliza energía para llevarlos a cabo.

Durante la fagocitosis por leucocitos el consumo de oxígeno, la incorporación de glucosa y el desdoblamiento del glucógeno aumentan significativamente.³⁶ La inducción de la fagocitosis produce también un incremento en la síntesis de ácido fosfórico y de fosfatidilinositol.³⁷ En células en cultivo de tejido, la adición de ATP aumenta la velocidad de la endocitosis³⁸ que, en cambio, es inhibida por venenos respiratorios o de otra clase. Sin embargo, este tipo de transporte carece de especificidad.

El englobamiento de material absorbido es indiscriminado, y a veces son ingeridas sustancias nocivas para la célula. Más adelante veremos que el contenido del material fagocitado puede ser digerido por enzimas presentes en la membrana o agregadas por lisosomas a la vacuola digestiva.

La pinocitosis no debe considerarse como un proceso que reemplaza al transporte activo, sino más bien como un mecanismo complementario. Por su intermedio, la célula adquiere un gran desarrollo de su interfase interna, a cuyo nivel el transporte activo y el pasivo se efectúan con mayor eficiencia que en la superficie de la membrana. En el capítulo 10 se mencionó la correlación que existe entre la

FIG. 21-10. Lisosomas aislados por centrifugación diferencial del hígado de la rata. Se observan partículas muy densas y una variedad de materiales densos contenidos dentro de la única membrana del lisosoma. 60,000 ×. (Cortesía de C. de Duve.)



pinocitosis y el flujo de membrana del sistema vacuolar de la célula. Todos estos procesos y los que describiremos posteriormente pueden interpretarse como un mecanismo general que rige la ingestión, digestión y excreción masivas de material.

LISOSOMAS

El concepto de lisosoma se originó por el desarrollo de técnicas de fraccionamiento celular utilizadas para la separación de diversos componentes subcelulares (véase cap. 7). En 1949, De Duve aisló un tipo de partículas con propiedades de centrifugación intermedia entre las mitocondrias y los microsomas, y un contenido elevado en fosfatasa ácida y otras enzimas hidrolíticas. Por centrifugación se calculó que estas partículas debían tener un diámetro de 0.2 a 0.8 μ y, en razón de sus propiedades enzimáticas, fueron denominadas *lisosomas*.³⁹

Estabilidad del lisosoma y contenido enzimático

Una de las características importantes de los lisosomas es su estabilidad en la célula viviente. Las enzimas se encuentran rodeadas de una membrana y no están disponibles en forma inmediata para actuar sobre el sustrato. Después de la separación con métodos suaves de homogeneización, es muy pequeña la cantidad de enzima que puede medirse por el agregado de moléculas del sustrato, por ejemplo, éster fosfórico; pero si las partículas son tratadas con procedimientos enérgicos, como soluciones hipotónicas o agentes tensioactivos (por ejemplo, Triton), la actividad enzimática aumenta considerablemente (figura 21-9).

Hasta ahora, en los lisosomas se han reconocido más de una docena de enzimas hidrolíticas. Todas éstas, junto con la fosfatasa ácida, comparten la propiedad de fragmentar compuestos biológicos en un medio ligeramente ácido. En la célula viviente, dichas enzimas (fosfatasa, glucuronidasa, sulfatasa, catepsina, etcétera) se encuentran dentro de la partícula y pueden actuar solamente sobre materiales incorporados a ella, es decir, sobre materiales fagocitados. Por efecto de un agen-

te nocivo, como un tóxico, las enzimas pueden liberarse y digerir toda la célula. En un lisosoma aislado, la ruptura de la membrana determina que el contenido enzimático sea aprovechado por los diferentes sustratos (figura 21-9).

Aunque el concepto original de lisosoma implica que se trata de una partícula multi-enzimática, es posible que sean halladas distintas enzimas hidrolíticas en partículas que posean diferentes propiedades de sedimentación y, por ende, diferente estabilidad.

Usando centrifugación en gradiente zonal, se ha demostrado que los lisosomas del hígado de vaca son heterogéneos en cuanto a su contenido enzimático.⁴⁰

Poliformismo del lisosoma

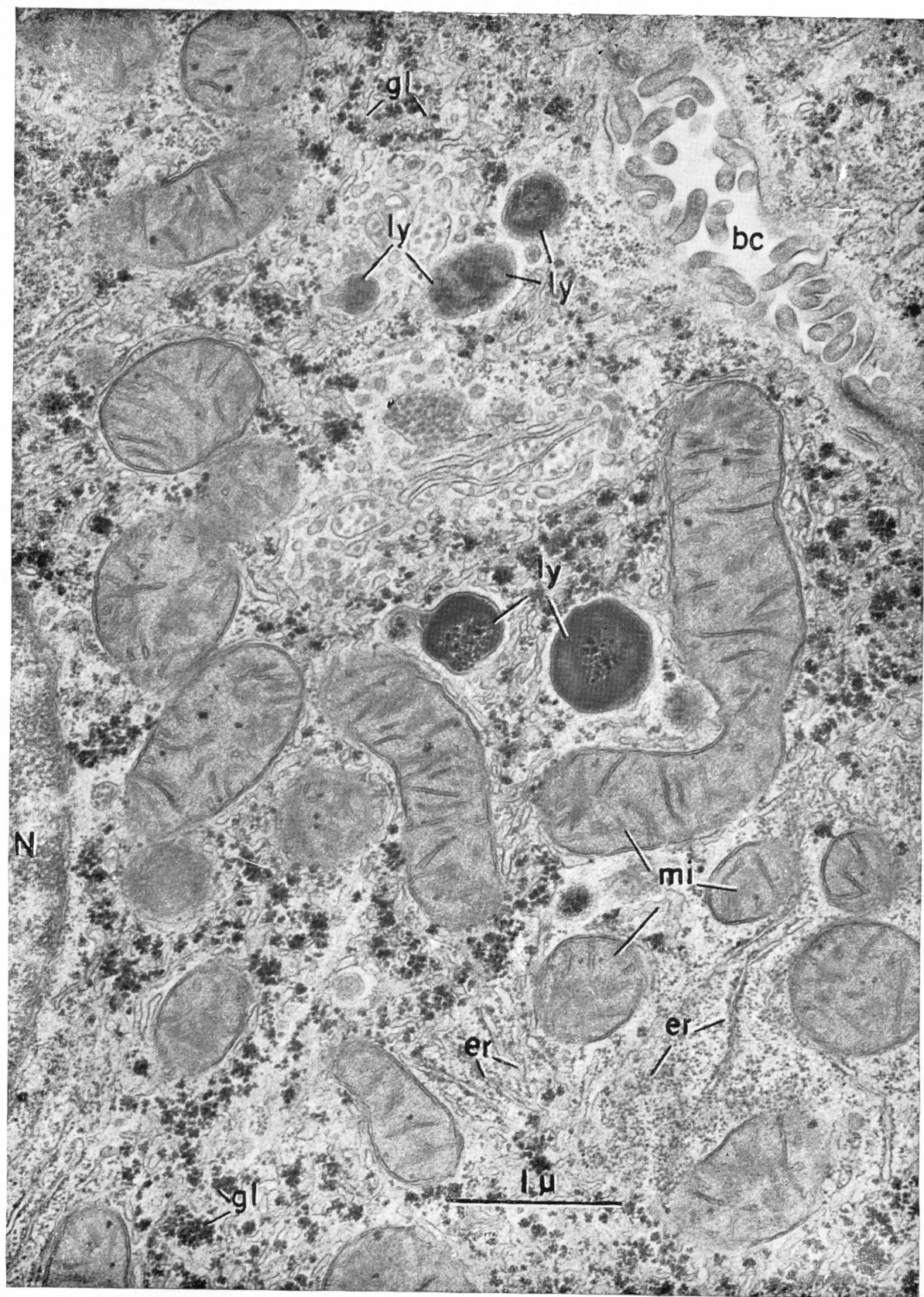
La observación realizada en la fracción lisosómica del hígado mediante el microscopio electrónico, permitió reconocer que, además de algunas mitocondrias típicas y microsomas que contaminaban la fracción, había cuerpos densos de unos 0.4 μ de diámetro, provistos de una sola membrana externa, y pequeños gránulos de alta densidad electrónica, similares a las moléculas de ferritina.⁴¹ Recientemente se han obtenido fracciones bastante puras de lisosomas hepáticos (fig. 21-10) y la separación en gran escala de estas partículas así como la de peroxisomas.

En células intactas de hígado se evidenciaron cuerpos con una morfología similar, denominados "cuerpos densos pericanaliculares" por su localización preferente a lo largo de los delgados canaliculos biliares (fig. 21-11).

La identificación de los lisosomas fue facilitada por la aplicación, en los estudios de microscopía electrónica, de técnicas histoquímicas para la fosfatasa ácida (fig. 21-12) (Novikoff, 1961). Sin embargo, persiste como un obstáculo el considerable polimorfismo de estas partículas en distintos tipos celulares e, incluso, en una sola clase de células.

De acuerdo con la interpretación corriente, el polimorfismo de los lisosomas proviene de la asociación de los lisosomas primarios con diferentes materiales que son fagocitados por la célula. La figura 21-13 resume estos conceptos.

FIG. 21-11. *Región periférica de una célula hepática en la que se observan un capilar biliar (bc) y diversos cuerpos interpretados como lisosomas (ly). N, Núcleo; mi, mitocondria; er, retículo endoplásmico; gl, glucógeno. 31,000 $\times$. (Cortesía de K. R. Porter.)*



Existirían cuatro tipos de lisosomas, de los cuales uno es el *lisosoma primario*; los otros tres pueden designarse en conjunto *lisosomas secundarios*.

a) El lisosoma primario (*gránulo de reserva*) representa un pequeño cuerpo cuyo contenido enzimático es sintetizado por los ribosomas y acumulado en el retículo endoplásmico. Desde allí penetra en la región del Golgi, donde se observa la primera reacción de la fosfatasa ácida.⁴³ El lisosoma primario contendría preferentemente un tipo de enzima, y sólo en el lisosoma secundario se completaría la dotación de hidrolasas ácidas. El proceso de formación de lisosomas primarios puede seguirse en cultivos de monocitos, que en presencia de proteínas séricas se transforman en macrófagos. En un período corto hay una considerable síntesis de enzimas hidrolíticas, susceptible de ser bloqueada por la puromicina. En estas células activadas, usando leucina- H_3 y radioautografía, se observó el si-

guiente orden en la transferencia de proteínas: retículo endoplásmico $\rightarrow$ complejo de Golgi $\rightarrow$ lisosomas.⁴⁴

b) El *lisosoma secundario*, también denominado *heterofagosoma* o *vacuola digestiva*, aparece después de la fagocitosis o pinocitosis de material extraño. Este cuerpo contiene el material ingerido dentro de una membrana y evidencia una reacción de fosfatasa positiva, que puede deberse a la fusión con un lisosoma primario. Una forma interesante de estudiar el fagosoma consiste en inyectar peroxidasa, que es englobada por las células y se reconoce mediante una reacción citotóxica (véase cap. 7).⁴⁵

En los macrófagos es posible observar que el *fagosoma*, o vesícula englobada, está rodeada de pequeñas vesículas del Golgi (*lisosomas primarios*) que se fusionan con él constituyendo el *lisosoma secundario*. Por la acción de enzimas hidrolíticas, ahora incorporadas, el material englobado es progresiva-

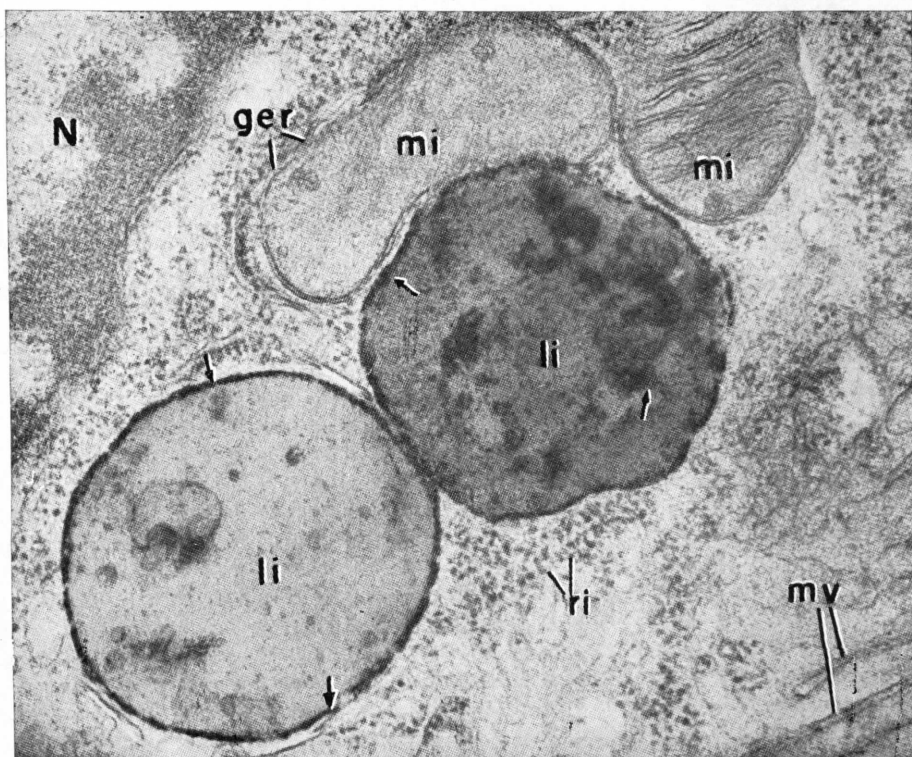


FIG. 21-12. Fotomicrografía electrónica del tubo proximal del riñón de ratón, dos horas después de la inyección de hemoglobina de buey. Se han formado en la región apical dos gotas de absorción (fagosoma o lisosoma) y la reacción de la fosfatasa ácida se hace positiva primero en la superficie (*flecha*) y luego en el interior del lisosoma. N Núcleo; ger, retículo endoplásmico granular; ri, ribosoma; mv, microvellosidad; li, lisosoma. 60,000 $\times$. (Cortesía de F. Miller.)

mente digerido. La velocidad e intensidad de la digestión dependen de la proporción y de la naturaleza química del material, y de la actividad y especificidad de las enzimas lisosómicas. En condiciones ideales, la digestión da como resultado productos de pequeño peso molecular que pueden atravesar la membrana lisosómica y ser incorporados a la célula.

c) Si la digestión es incompleta, se forman *cuerpos residuales*, que en algunas células, como en la ameba y diversos protozoarios, son eliminados por medio de la defecación. En cambio, en otras células permanecen durante largo tiempo, y es probable que tengan importancia en el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, las inclusiones de pigmento que se encuentran en las células nerviosas de animales viejos, pueden ser el resultado de este tipo de proceso.

Los cuerpos residuales desempeñan un papel significativo en patología. En ciertas enfermedades metabólicas, la falta de algunas de las enzimas lisosómicas da lugar a la acumulación de sustancias en la célula. Así ocurre en las distintas *lipidosis*, en las que se produce el almacenamiento de fosfolípidos o esfingolípidos en formaciones membranosas. La

acumulación de glucógenos dentro de los lisosomas puede ocasionar, asimismo, graves trastornos. Experimentalmente, la inyección de sustancias como el Triton WR-1339, el dextrano o la sacarosa, origina cuerpos residuales que son acumulados pero no digeridos, evidenciándose en estos casos muchos lisosomas hinchados. Se han descrito alrededor de doce enfermedades congénitas vinculadas con los lisosomas.

d) La *vacuola autofágica*, o *citolisosoma* (*autofagosoma*), es un caso especial en el cual el lisosoma contiene fracciones celulares (mitocondria, porciones del retículo endoplásmico) en vías de digestión. En determinadas condiciones fisiológicas y patológicas se forman gran número de estas vacuolas. Por ejemplo, las células hepáticas de animales en ayuno presentan múltiples vacuolas autofágicas, en algunas de las cuales pueden hallarse restos mitocondriales. Por medio del mecanismo citado la célula lleva a cabo la degradación de sus propios constituyentes sin daño irreparable (De Duve, 1967, y Allison, 1967). En el hígado, la autofagia puede ser inducida por inyección de la hormona pancreática *glu-*

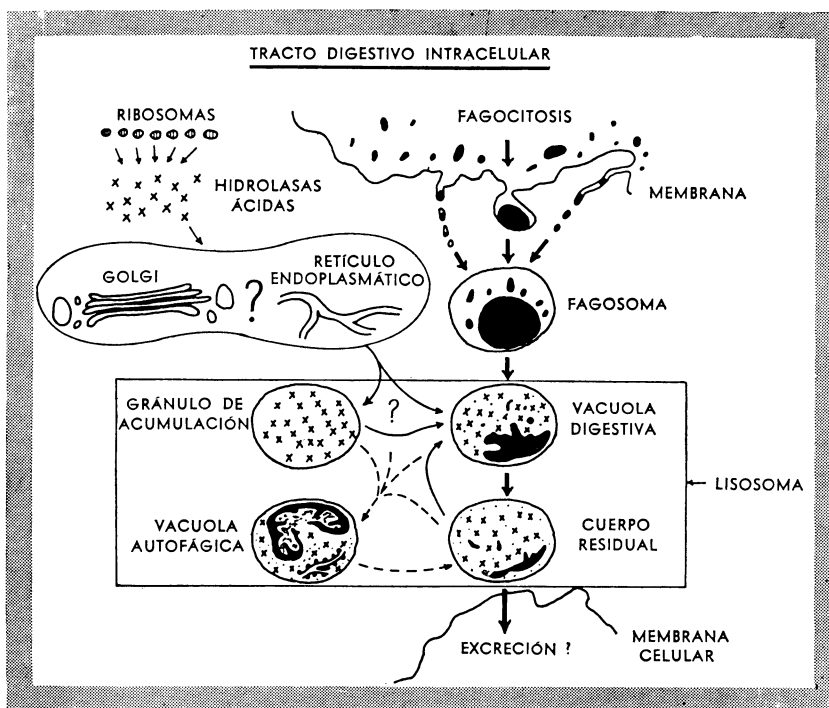


FIG. 21-13. Esquema que representa cuatro formas funcionales de lisosomas y sus posibles interrelaciones. (Cortesía de C. de Duve.)

cagón. Este tratamiento suscita un considerable aumento de citolisosomas, mientras que el número de lisosomas primarios disminuye. Ello indica que los lisosomas preexistentes son, quizá, la fuente de enzimas hidrolíticas de las vacuolas autofágicas.⁴⁶

Los lisosomas y el concepto de espacio exoplásmico

De acuerdo con lo expuesto, los lisosomas primarios pueden considerarse como un producto de secreción de la célula, y al igual que otras secreciones (véase cap. 25), son sintetizados por los ribosomas, entran en el retículo endoplásmico y pasan al cuerpo de Golgi en su etapa final. Puesto que mediante este mecanismo una célula puede elaborar diferentes clases de lisosomas, así como también *peroxisomas* y muchos otros productos de secreción, es posible deducir que existe un tipo de *especificidad topográfica* en este sistema retículo-endoplásmico → Golgi. En otras palabras, las distintas secreciones seguirían diferentes rutas dentro de los canales de los sistemas de membranas intracelulares. Es interesante destacar que el complejo de Golgi puede añadir a la secreción algunos productos específicos, como proteínas antigénicas y glucoproteínas. Usando una mezcla especial de ácido crómico y ácido fosfotúngstico, se observó con el microscopio electrónico que las glucoproteínas se tiñen en la región del Golgi, así como alrededor de cuerpos densos (presumiblemente lisosomas) y en las cubiertas celulares.⁴⁷ Se ha sugerido que las glucoproteínas son sintetizadas en la región del Golgi y que emigran por medio de pequeñas vesículas hacia los lisosomas o la superficie celular, para constituir la cubierta extracelular (véase cap. 10).

En el caso de los lisosomas secundarios, el sistema de secreción intracelular está en cierto modo acoplado con otro de origen extracelular, el espacio exoplásmico, formado durante la endocitosis. Hemos visto antes que este proceso se relaciona con la actividad de la membrana plasmática. Es importante destacar que los productos incorporados por endocitosis no entran probablemente nunca en el retículo endoplásmico. Puede admitirse que existe una *compuerta unidireccional* entre los sistemas endoplasmático y exoplasmático, puesto que los productos fluyen en un sentido (del espacio endoplásmico al exoplásmico), pero no en el inverso. Esta compuerta estaría localizada en la región del Golgi,

donde tendría lugar la transferencia de sustancias entre los dos espacios. Sin embargo, hasta el presente sólo es posible especular acerca de su naturaleza. La fusión entre la membrana plasmática, que limita el espacio exoplásmico y la membrana del retículo endoplásmico, puede ser evitada debido a que existen entre ambas diferencias en el espesor, ultraestructura y composición química (véase cap. 9). En el esquema de la figura 21-13, se representa con flechas gruesas el flujo del espacio exoplásmico a partir de la endocitosis original (fagocitosis y pinocitosis) y la excreción de residuos. Al mismo tiempo, con flechas finas se indica el flujo unidireccional de productos entre los espacios intracelulares y extracelulares.

Lisosomas y fagocitosis

No es difícil proporcionar ejemplos de la relación existente entre los lisosomas y la fagocitosis y pinocitosis. Un caso interesante es el que se observa en los túbulos renales cuando se inyecta a un animal algún material extraño, como la enzima peroxidasa. Mediante la reacción de la peroxidasa puede seguirse la formación y el destino del fagosoma.⁴⁸ La hemoglobina inyectada es digerida por la célula del túbulo renal y el fagosoma denota una reacción de fosfatasa positiva, que comienza en la periferia y "penetra" con el tiempo en el interior (fig. 21-12).

Después de la inyección de hemoglobina se visualizaron vacuolas autofágicas con fragmentos mitocondriales y cuerpos residuales de estructura laminada, que contienen material no digerido (probablemente de naturaleza lipídica).

La microscopía electrónica y los estudios experimentales realizados en granulocitos demostraron que los gránulos son, en realidad, paquetes de enzimas digestivas correspondientes a los lisosomas. Si dichos leucocitos se ponen en contacto con bacterias, éstas son englobadas y los gránulos incorporados y disueltos dentro de las vacuolas digestivas. Eventualmente, puede suceder que las células pierdan la mayoría de los gránulos al terminar el proceso y que en algunas infecciones virulentas el leucocito sea destruido.⁴⁹

Lisosomas y autofagia celular

Muchas son las pruebas de que los lisosomas intervienen en la eliminación de fragmentos de células, de células enteras y aun de

material extracelular. Ya hemos mencionado el caso de las células hepáticas durante el ayuno. En la metamorfosis de los anfibios, se produce una reorganización considerable de tejidos con destrucción de gran número de células, que se lleva a cabo por medio de los lisosomas. Así, la pérdida de la cola de los renacuajos es ocasionada por la acción de catepsinas (enzimas proteolíticas) contenidas en los lisosomas. A medida que tiene lugar la regresión de la cola existe un aumento progresivo en la concentración de catepsina, mientras que la cantidad total de enzimas permanece constante.⁵⁰

En el capítulo 25 se mencionará el posible papel de los lisosomas en la regulación de la cantidad de productos de secreción.

Hay evidencias que indican que las enzimas lisosómicas son susceptibles de descargarse fuera de la célula para producir efectos líticos. Éste puede ser el mecanismo que utilizan los *osteoclastos* para resorber el hueso, cuyos fragmentos serían englobados y digeridos por las células.

En el tejido óseo cultivado, que recibe un exceso de vitamina A, existe una resorción aumentada que se debe aparentemente a la "activación" de los lisosomas. Ello puede ser la causa de las fracturas espontáneas que ocurren en animales intoxicados con vitamina A. El efecto opuesto se observa en presencia de cortisona e hidro cortisona, esteroides que tienen una acción antiinflamatoria bien conocida y poseen también un efecto estabilizador sobre la membrana de los lisosomas.

En resumen: se considera actualmente a los lisosomas como partículas provistas de enzimas hidrolíticas que intervienen en la digestión de materiales incorporados a la célula y en la eliminación de materiales intracelulares o extracelulares. Estos conceptos permiten comprender el polimorfismo de los lisosomas en diversas células. En el caso de algunos tejidos, debe guardarse cierta reserva. En las neuronas, por ejemplo, las partículas que contienen enzimas hidrolíticas pueden ser más complejas. No es improbable que las partículas con propiedades de sedimentación diferentes y distinta estabilidad respecto del sustrato contengan enzimas "lisosómicas" particulares.⁴⁹

MICROCUERPOS O PEROXISOMAS

Con el progreso de los métodos de fraccionamiento celular se logró aislar del hígado,

aparte de los lisosomas, a un segundo grupo de partículas menos comunes, ricas en catalasa, D-aminoacido oxidasa y, en menor grado, en urato oxidasa.⁵⁴ Al principio se supuso que dichas enzimas estaban asociadas con los lisosomas, pero mediante el empleo de ultracentrifugación en gradientes de agua pesada o glucógeno, además de sacarosa, fue posible separarlas casi completamente de las hidrolasas lisosómicas.

Las observaciones con microscopía electrónica sugieren que estas partículas corresponden a los denominados microcuerpos o peroxisomas encontrados en células hepáticas y renales.^{52, 53}

Los microcuerpos son gránulos ovoides de 0.1 a 0.5 μ de diámetro, mucho menos numerosos que las mitocondrias y los lisosomas. Están limitados por una sola membrana y contienen una sustancia finamente granulosa que puede condensarse en el centro para formar una masa opaca y homogénea.

En un reciente estudio cuantitativo efectuado en hepatocitos de rata se comprobó que el diámetro promedio de los peroxisomas era de 0.6 a 0.7 μ . El número de ellos por célula varía entre 70 y 100, mientras que el de lisosomas es de 15 a 20.⁵⁴

Como en el caso de los lisosomas, los microcuerpos se originan aparentemente en el retículo endoplásmico. El proceso de formación de estos organoides ha sido estudiado en hepatocitos de embrión de ratón mediante el uso de una reacción histoquímica adaptada al microscopio electrónico, que incluye la oxidación de la 3-3' diaminobencidina (DAB).⁵⁵

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Allison, A.: (1967) *Lysosomes and disease. Scient. Amer.*, 217:62.
- Anderson, B. and Ussing, H. H.: (1960) Active transport. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2:371.
- Brachet, J.: (1957) *Biochemical Cytology*. Academic Press, New York.
- Ciba Foundation Symposium: (1963) *Lysosomes*. J. & A. Churchill, London.
- De Duve, C.: (1967) *Lysosomes and phagosomes. Protoplasma*, 63:95.
- Eisenman, G., Sandblom, J. P. and Walker, J. L., Jr.: (1967) Membrane structure and ion permeation. *Science*, 155:3765.
- Fuhrman, F.: (1959) Transport through biological membranes. *Ann. Rev. Physiol.*, 21:19.
- Holter, H.: (1960) Pinocytosis. *Int. Rev. Cytol.*, 8:481.
- Mullins, L. J.: (1968) From molecules to membranes. *Fed. Proc.*, 27:898.
- Novikoff, A. B.: (1961) In: *The cell*, 2:423. (Bra-

- chet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Palade, G. E.: (1958) Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries. *Anat. Rec.*, 130:467.
- Ponder, E.: (1961) The cell membrane and its properties. In: *The cell*, vol. 2, p. 1. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic, Press, New York.
- Robertson, R. N.: (1960) Ion transport and respiration. *Biol. Rev.*, 35:231.
- Roche, M. (ed.) (1960) Symposium on active transport, part 2. *J. gen. Physiol.*, 43:5.
- Rustad, R. C.: (1961) Pinocytosis. *Scient. Amer.*, 204:121.
- Symposium on the plasma membrane*: (1962) New York Heart Association, Inc.
- BIBLIOGRAFÍA CITADA**
- Knaysi, G. A.: (1951) *Elements of bacterial cytology*. 2nd ed. Comstock, Pub. Associates, Ithaca, New York.
 - Woodbury, J. W.: (1961) The cell membrane: ionic and potential gradients and active transport. In: *Neurophysiology*.
 - Collander, R. and Barlund, H.: (1933) *Acta bot. fenn.*, 11:1.
 - Harris, E. J. and Mezels, M.: (1951) *J. Physiol.*, 113:506.
 - Ussing, H. H.: (1960) Physiology of the cell membrane. *J. gen. Physiol.*, 43:5, part 2 suppl. 1, p. 135.
 - Leaf, A.: (1960) Physiology of the cell membrane. *J. gen. Physiol.*, 43:5, part 2, suppl. 1, p. 175.
 - Wittembury, G.: (1960) Physiology of the cell membrane. *J. gen. Physiol.*, 43:5, part 2, suppl. 1, p. 43.
 - Eccles, J. C.: (1957) *Physiology of nerve cells*. Johns Hopkins Press, Baltimore.
 - Backer, P. F., Hodgkin, A. L. and Shaw, T. I.: (1962) *J. Physiol.* (London), 164:330 and 335.
 - Woodbury, J. W.: (1969) En "Basic Mechanisms of the Epilepsies", p. 76. (Ed. H. H. Jasper y col.) Little, Brown y Cia., Boston.
 - Solomon, A. K.: (1960) Physiology of the cell membrane. *J. gen. Physiol.*, 43:5, part 2, suppl. 1, p. 1.
 - Kennedy, E. P., Fred Fox, C. and Carter, J. R.: (1966) *J. gen. Physiol.*, 49:347.
 - Cohen, G. and Monod, J.: (1957) *Bact. Rev.*, 21:169.
 - Fischer, H. and Wagner, N. I.: (1954) *Naturwissenschaften*, 41:532.
 - Giese, A. C.: (1968) *Cell Physiology*. 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
 - Physiology of the cell membrane: (1960) *J. gen. Physiol.*, 43:5, part 2, suppl. 1.
 - Post, R., Merritt, C., Kinsolving, C. and Albright, C.: (1960) *J. biol. Chem.*, 235:1796.
 - Glynn, J. M.: (1962) *J. Physiol.* (London), 160:18.
 - Whittman, R.: (1962) *J. Biochem.*, 84:110.
 - Mitchell, P.: (1961) *Nature*, 791:144.
 - Marchesi, V. T. and Palade, G. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:385.
 - Lewis, W. H.: (1931) *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 49:17.
 - Holter, H. and Marshall, J. M., Jr.: (1954) *Comp. Rend. Lab. Carlsberg, série chim.*, 29:27.
 - Chapman-Andersen, C. and Holter, H.: (1955) *Exp. Cell Res.*, Suppl. 3:52.
 - Jacques, J. P.: (1968) XII Int. Congr. Cell Biol. Brussels. *Excerpta med. Int. Congr.*, series 166:90.
 - Brandt, P. W.: (1958) *Exp. Cell Res.*, 15:300.
 - Brandt, P. W.: (1962) A consideration of the extraneous coats of the plasma membrane. In: *Symposium on the plasma membrane*. New York. Heart Association, Inc. *Circulation*, 26:1075.
 - Brandt, P. W. and Pappas, G. D.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 8:675.
 - Schumaker, V. N.: (1958) *Exp. Cell Res.*, 15:314.
 - Chapman-Andersen, C. and Holter, H.: (1964) *Compt. Rend. Lab. Carlsberg*, 34:211.
 - Gosselin, R. E.: (1967) *Fed. Proc.*, 26:987.
 - Brandt, P. W. and Freeman, A. R.: (1967) *Science*, 155:582.
 - Palade, G. E. and Bruns, R. R.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:633.
 - Karnowsky, M. J.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:213.
 - Bessis, M. and Breton-Gorius, J.: (1959) *Rev. Hémat.*, 14:165.
 - Sbarra, A. J. and Karnowsky, M. M.: (1959) *J. biol. Chem.*, 234:1355.
 - Sastry, P. S. and Hokin, L. E.: (1966) *J. biol. Chem.*, 241:3354.
 - Gropp, A.: (1963) In: *Cinematography in Cell Biology*, p. 279. (G. G. Rose, ed.) Academic Press, New York.
 - De Duve, C.: (1963) General properties of lysosomes. In: *Lysosomes*, p. 1. Ciba Foundation Symp. J. and A. Churchill, London.
 - Rahman, V. E., Lowes, J. F., Nance, S. D. and Thomson, J. F.: (1967) *Biochim. biophys. Acta*, 146:484.
 - Novikoff, A. B., Beaufay, H. and De Duve, C.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, suppl. 2:179.
 - Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S. and De Duve, C.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:207.
 - Essner, E. and Novikoff, A. B.: (1962) *J. Cell Biol.*, 15:289.
 - Cohn, Z. A.: (1968) XII Int. Congr. Cell Biol. Brussels. *Exp. Med. Int. Congr. Sci.*, 166:6.
 - Straus, W.: (1967) *J. Histochem. Cytochem.*, 15:375 and 381.
 - Deter, R. L., Baudhuin, P. and De Duve, C.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:C11.
 - Rambourg, G.: (1966) *Anat. Rec.*, 154:41.
 - Straus, W.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:541.
 - Hirsch, J. G. and Cohn, Z. A.: (1960) *J. exp. Med.* 112:1005.
 - Weber, R. and Niehus, B.: (1961) *Helv. Physiol. pharmacol. Acta*, 19:103.
 - Beaufay, H. and Berther, J.: (1963) In: Methods of separation of subcellular structural components. *Biochem. Soc. Symp.*, N. 23, p. 66. (Grant, J. K., ed.) Cambridge, University Press, London.
 - Rodhin, J.: (1954) *Thesis*. Karolinska Institutet Stockholm.
 - Rouiller, C. and Bernhard, W.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:355.
 - Loud, A. V.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:27.
 - Essner, E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:42a.

Cilios, centríolos, microtúbulos y movimiento ameboide

La energía producida por las células se acumula en forma de adenosintrifosfato (ATP) o en otros fosfatos ricos en energía, y además de ser empleada en algunos procesos químicos, como la síntesis proteica, es consumida en los diversos tipos de *actividad mecánica*, entre los cuales el más importante se exterioriza por el *movimiento celular*. Éste no es sólo una manifestación de la energía mecánica de la célula, sino también uno de los signos más objetivos de su vitalidad. Cuando en un cultivo de tejidos se observa el desplazamiento de una célula, se tiene la sensación de que realmente está “viva”. Sin embargo, los fenómenos vitales ocurren muchas veces sin movimientos aparentes del protoplasma. En ciertos casos, el movimiento celular se halla estrictamente limitado al protoplasma y no ocasiona ninguna deformación de la célula, denominándosele *corriente citoplásmica* o *ciclosis*. En otros casos, se evidencia por la emisión de pseudópodos y conduce a un verdadero desplazamiento celular (*ameboidismo*). Asimismo, los movimientos pueden producirse en apéndices especialmente diferenciados (*movimientos ciliar y flagelar*) o en fibrillas citoplásmicas específicas (*movimiento muscular*).

Los movimientos ameboide, ciliar y flagelar son los principales medios de locomoción en los organismos unicelulares. En los vegetales el desplazamiento de células tiene lugar principalmente por crecimiento y cambio en el contenido de agua (turgencia). Algunos gametos, no obstante, están dotados de flagelos.

En los animales, las células embrionarias son susceptibles de desplazarse de manera activa durante la *organogénesis* (desarrollo de órganos) y la *histogénesis* (desarrollo de los tejidos). También en cultivos de tejidos,

en la reparación de heridas y en el cáncer, las células se mueven bastante libremente. En los animales adultos, sólo los gametos, los epitelios ciliados, las células ameboides libres y las células de los diferentes tipos de tejido muscular ejecutan movimientos visibles.

A continuación se consideran los tipos más primitivos de movimiento, dejando el estudio de la contracción muscular para el próximo capítulo.

CILIOS Y MOVIMIENTOS CILIARES

El movimiento ciliar está adaptado al medio líquido y es cumplido por pequeños apéndices especialmente diferenciados. Se trata de filamentos contráctiles, variables en número y tamaño, que reciben el nombre de *flagelos*, si son escasos y largos, y de *cilios*, si son cortos y numerosos.

Estas prolongaciones motoras se presentan con relativa frecuencia en toda la escala zoológica y en algunas células vegetales. En los protozoarios, particularmente en los infusorios, hay centenares o miles de pequeños cilios, cuyo movimiento permite al organismo desplazarse con rapidez en el medio líquido. En regiones especiales de estos infusorios ciertos cilios se fusionan y forman apéndices cónicos más gruesos denominados *cirros*, o las membranas conocidas como *ondulantes*.

En los protozoarios, toda la clase de los flagelados se caracteriza por la presencia de flagelos. Entre los metazoarios, sólo los espermatozoides tienen la propiedad de desplazarse como células aisladas por medio de esos apéndices. En cambio, es relativamente fácil encontrar células epiteliales provistas de cilios vibrátiles y capaces de constituir verdaderas láminas ciliadas que pueden cubrir áreas grandes de la superficie externa del

cuerpo y determinar el movimiento del animal. Tal es el caso de algunos platelmintos y nemertinos, y también el de las larvas de equinodermos, moluscos y anélidos. Con mayor frecuencia, las láminas epiteliales ciliadas revisten cavidades o tubos internos de los metazoarios, como las vías aéreas del aparato respiratorio o parte del tracto genital, donde todos los cilios se mueven simultáneamente en la misma dirección produciendo corrientes líquidas. Estas sirven para eliminar partículas sólidas en suspensión que pueden causar daño al organismo, como ocurre en el aparato respiratorio, o bien permiten su desplazamiento a lo largo del conducto: un ejemplo ilustrativo es el de los huevos de anfibios y mamíferos que recorren el oviducto con la ayuda de los cilios vibrátiles.

Ultraestructura de los cilios y flagelos

Los componentes esenciales del aparato ciliar son: a) el *cilio*, prolongación cilíndrica delgada que se proyecta a partir de la superficie libre de la célula; b) el *cuerpo basal* o *gránulo*, organoide intracelular semejante al centríolo, a partir del cual se forma, y c) finas fibrillas, denominadas *raíces de los cilios*, que existen en algunas células y surgen de los corpúsculos basales, para converger en un haz cónico cuyo vértice termina a un lado del núcleo. Los cuerpos basales se encuentran incluidos en la capa ectoplasmática subyacente a la superficie y por lo general están espaciados de manera uniforme y dispuestos en hileras paralelas.

Los cilios y flagelos son filamentos sumamente delgados cuyo espesor se halla a menudo en el límite del poder de resolución del microscopio óptico.

En varios epitelios hay apéndices de forma similar a la de los cilios, pero inmóviles. Reciben la denominación de *estereocilios* y son ejemplos de ellos las prolongaciones apicales de las células del epidídimo, que parecen intervenir en la eliminación de la secreción celular. A nivel de la mácula y de la cresta del oído interno se encuentran asimismo estereocilios, junto a cilios móviles o quinetocilios.

Los primeros histólogos, a fines del último siglo, obtuvieron pruebas de que los cilios y flagelos estaban compuestos por finos elementos fibrilares. Ocasionalmente, la cola del espermatozoide fue vista subdividirse en finísimas fibrillas.¹ Más tarde, con el empleo del microscopio de polarización, se puso de ma-

nifiesto que los cilios y los flagelos presentaban una birrefringencia intrínseca y una birrefringencia de forma (véase cap. 6). El microscopio electrónico proporcionó una imagen directa de la ultraestructura de la cola del espermatozoide, comprobándose que ésta contenía 11 fibrillas de las cuales dos eran más pequeñas.² En una serie extensa de investigaciones realizadas en los espermatozoides del helecho (anterozoides), se encontró que los cilios se descomponían en 11 fibrillas.³ Esta estructura fundamental fue confirmada sin excepciones, tanto para los cilios como para los flagelos, cuando los progresos técnicos permitieron realizar cortes finos de tejidos.⁴ En sección trasversal, el diámetro total del cilio es de 2000 Å y existe una membrana externa que rodea la matriz ciliar y se continúa con la membrana plasmática. Incluidos en esta matriz se hallan nueve pares de fibrillas con una subestructura tubular, cada una de las cuales tiene de 180 a 250 Å de diámetro. Las dos fibrillas centrales aparecen como túbulos sencillos (fig. 22-1). El plano perpendicular a la línea que une a los dos túbulos centrales divide al cilio en dos mitades simétricas, derecha e izquierda. Dicho plano pasa entre uno de los pares periféricos.

Actualmente, está bien demostrado que el plano del movimiento ciliar es perpendicular al plano de simetría. Los adelantos técnicos permitieron reconocer detalles adicionales: en uno de los túbulos de cada par se observan proyecciones o "brazos" que salen de uno de sus lados, siempre en la misma posición. Los túbulos que poseen brazos se denominan *subfibras A* y los otros, *subfibras B*. Es interesante destacar que en todos los cilios los brazos apuntan en la misma dirección, con una disposición en el sentido de las agujas del reloj desde su base hacia el extremo libre.^{5, 6} El plano de simetría y la dirección de los brazos permite numerar los pares periféricos de túbulos consecutivamente del 1 al 9. El túbulo A es en ocasiones ligeramente más grande y se encuentra algo más cerca del centro del cilio. En la matriz, hay nueve puntos que corresponden a cortes trasversales de filamentos delgados (50 Å de grosor), orientados longitudinalmente, apreciándose también una vaina central que rodea ambos túbulos centrales, así como puentes o rayos de una rueda que se extienden desde la vaina central a la subfibra A.⁷ La figura 22-2 evidencia uno de los esquemas más complejos de la

subestructura ciliar, como se la observa en un corte trasversal.⁸

El uso de coloración negativa en microscopía electrónica (véase cap. 6) ha permitido demostrar la naturaleza tubular de cada fibrilla y detalles complementarios de su organización macromolecular. La solución colorante (por ejemplo, fosfotungstato) penetra

en la luz del túbulo y permite resolver los filamentos y las unidades con aspecto de cuentas de rosario que componen la pared.^{9, 11} Se han encontrado filamentos de aproximadamente 40 Å de diámetro, en número de 10 a 12 por corte trasversal. Esta estructura es semejante a la hallada en los túbulos periféricos y centrales, así como en los microtú-

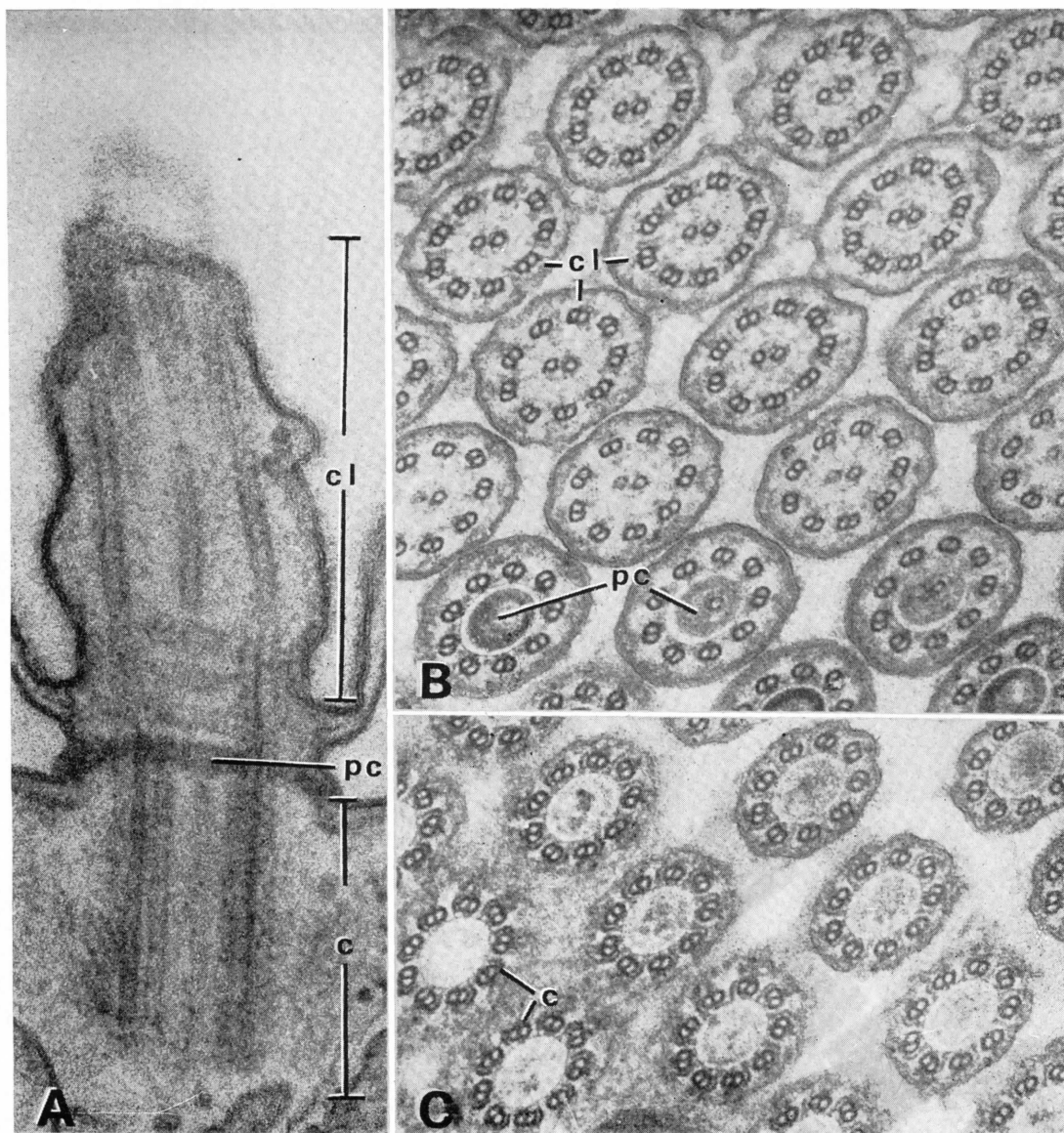


FIG. 22-1. Fotomicrografía electrónica de cilios, en corte longitudinal y trasversal. A Cilio de *Paramecium aurelia* con el centriolo o cuerpo basal (c), la placa ciliar (cp) y el cilio (cl). B y C Cortes trasversales de cilios en *Euplotes eurystomus*. B Cortes del cilio y de la placa ciliar. 110,000 $\times$. C El corte pasa por el cuerpo basal (c) o centriolo. Obsérvese la falta de los túbulos centrales y el número triple de los túbulos periféricos. 70,000 $\times$. (Cortesía de J. André y E. Fauret-Fremiet.)

bulos en general (véase más adelante). Los filamentos se presentan como cuentas, correspondiendo cada una de ellas a una subunidad básica. Éstas se disponen en el plano de la pared tubular a la manera de un enrejado de 40×50 A (fig. 22-3). La estructura tubular del cilio ($9 + 2$) se mantiene en longitud, extendiéndose los túbulos centrales considerablemente, mientras que los periféricos van desapareciendo a medida que nos aproximamos al extremo distal.¹²

Ultraestructura de los cuerpos basales o quinetosomas y centriólos

Desde los clásicos trabajos de Henneguy y Lenhossek, en 1897, se presumió que los cuerpos basales o quinetosomas ciliares y flagelares eran homólogos a los centriólos que se hallaban en los husos mitóticos (fig. 13-5) y, efectivamente, en algunas células el centriolo que participaba en la mitosis podía al mismo tiempo formar parte de un cilio. Esta homología fue plenamente confirmada con la introducción de la microscopia electrónica. Los centriólos y los cuerpos basales aparecen como cilindros de 1200 a 1500 A de diámetro y de 3000 a 20.000 A (2μ) de longitud. Al igual que en los cilios existe en ellos una pared externa compuesta por 9 pares de túbulos dispuestos en círculo. Cada grupo se halla constituido por 3 túbulos (en lugar de los pares que se encuentran en los cilios) oblicuamente dispuestos con respecto al centro (fig. 22-4). Los túbulos tienen aproximadamente 250 A de diámetro y una pared de 45 A. El más interno se denomina A y el más externo C. No hay túbulos centrales en el centriolo; los periféricos carecen de brazos, pero a veces puede verse un conjunto de 9 rayos curvos proyectándose hacia el centro. Los cuerpos basales están cerrados en su extremo externo por una *placa terminal* de alrededor de 300 A, espesor que los separa de la base del cilio (fig. 22-1).

Raíces ciliares. En algunas células hay raíces ciliares que proceden del cuerpo basal. Se han descrito dos tipos: 1) fibrillas radiculares estriadas que presentan bandas transversales con un período de 550 a 700 A, que se repite regularmente, y 2) estructuras tubulares de 200 A de diámetro. En las primeras fueron observadas cinco subbandas intraperiódicas.

Se desconoce el significado de estas raíces, que solamente se encuentran en ciertos materiales pero no en otros.

Los flagelos de los espermatozoides de mamíferos cuentan con un componente que no se aprecia en los cilios. Se trata de una fibrilla helicoidal situada en la región periférica y a la que se ha llamado *hélice cortical*.¹³ En ciertos espermatozoides de anfibios existen estructuras adicionales, como una aleta a modo de hoja delgada que se proyecta en un plano perpendicular al de los filamentos centrales.¹⁸

Bioquímica de los cilios

Los cilios y flagelos tienen la siguiente composición expresada en peso seco: 70 a 84 por ciento de proteínas, 13 a 23 por ciento de lípidos, 1 a 6 por ciento de hidratos de carbono y 0,2 a 0,4 por ciento de nucleótidos. Se ha conseguido separar cilios del infusorio *Tetrahymena*, y después de solubilizar su membrana plasmática, pudieron aislarse proteínas ciliares específicas.^{16, 17} Con el agente quelante EDTA algunas de ellas se solubilizan, mientras que otras permanecen insolubles. Su observación con el microscopio electrónico demostró que los componentes solubles provienen de los brazos de la subfibrilla A y de la fibrilla central. Esta proteína, también denominada *dineína*, contiene prácticamente toda la actividad de ATPasa ciliar. Puede separarse en dos fracciones: una que sedimenta a 30 S y la otra, probablemente una subunidad, que lo hace a 14 S. En experimentos de reconstitución, se comprobó que el agregado de proteínas solubles a las insolubles, en presencia de Mg^{++} , da lugar a la reaparición de los brazos en las subfibrillas A. Se ha sugerido que la molécula de dineína de 14 S, cuyo tamaño es de 90 A por 140 A, forma las unidades individuales de los brazos.

Recientemente fue aislada la proteína que compone las fibras externas, por medio de la solubilización en CLK 0,6 M. Su coeficiente de sedimentación es de 6 S, su peso molecular de 104.000 y su composición en aminoácidos semejante a la de la actina.¹⁷ Los resultados de estos estudios son análogos a los de otros realizados en colas de espermatozoides y a

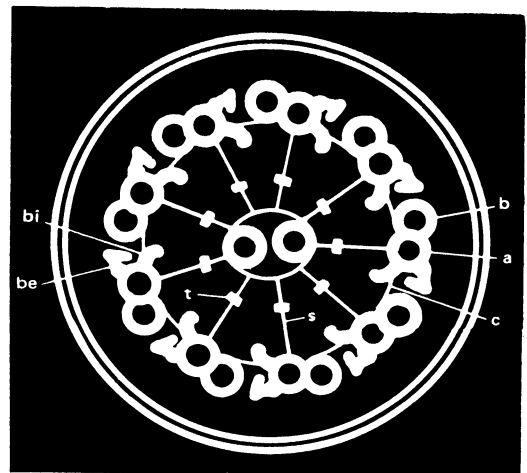


FIG. 22-2. Esquema de un corte transversal de un cilio mostrando: subfibrilla A (a), subfibrilla B (b), conexión entre ambas subfibrillas (c), brazo interno (bi), brazo externo (be), fibra radial (s), corte del filamento longitudinal de 50 A (t). (De R. D. Allen.)

raíz de los cuales se separaron dos proteínas de 6 S. La que proviene de los nueve pares externos se une con menos facilidad a la colchicina —H³ que las procedentes de los túbulos centrales.¹⁸ El problema de la bioquímica de estas estructuras tubulares será considerado junto con el de los microtúbulos.

Fisiología del movimiento ciliar

El movimiento ciliar se analiza fácilmente raspando con una espátula el epitelio faríngeo de la rana o del sapo, y colocando el producto del raspado con una gota de líquido fisiológico, entre un portaobjetos y un cubreobjetos. En la superficie libre de las células epiteliales se ven los cilios vibrátiles animados de rapidísimos movimientos. Si se observa una hilera de cilios, puede apreciarse que la contracción es *metacrónica* en el plano de la dirección del movimiento; o sea, se inicia

en un cilio un poco antes o un poco después que en el inmediato. De este modo, aparecen verdaderas ondas de contracción. En cambio, en la hilera perpendicular a la dirección del movimiento, la contracción es *isocrónica*: todos los cilios se hallan simultáneamente en la misma fase.

Esta coordinación del movimiento ciliar implica la existencia de un mecanismo de regulación de naturaleza desconocida. La contracción rítmica de los cilios ha sido interpretada de diferentes modos. Para explicar el ritmo metacrónico¹⁹ se ha invocado un mecanismo doble, que comienza por la *excitación intraciliar* y sigue con la *conducción interciliar*.

El mecanismo evidentemente no depende del sistema nervioso, puesto que persiste aun después que el epitelio se separa del resto

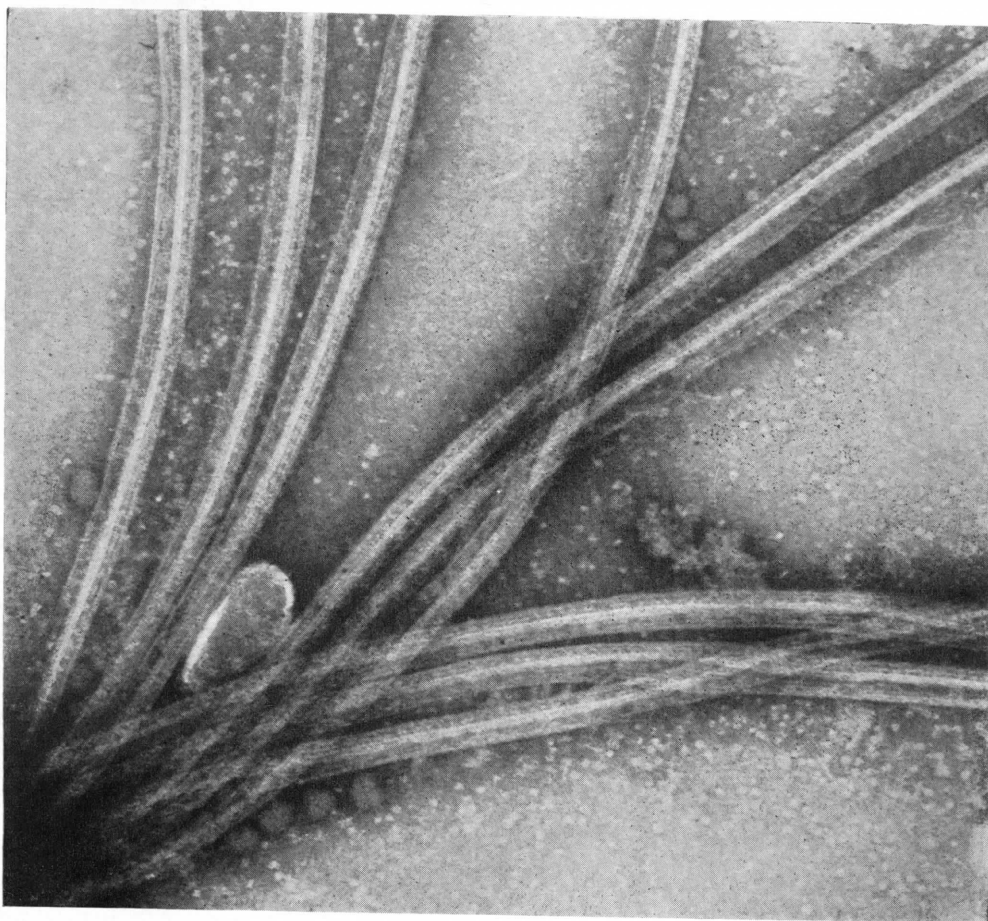


FIG. 22-3. Filamento axil de un espermatozoide de *Childia groenlandica*. Se observan, con coloración negativa, los 9 pares periféricos de microtúbulos. Véase la estructura fina con las subunidades en la pared del microtúbulo. 108,000 $\times$. (Cortesía de D. P. Costello y C. Henley.)

del organismo. Sin embargo, la existencia de una continuidad citoplásmica es indispensable para su mantenimiento, pues si se hace un corte en la hilera de cilios, las ondas de contracción de los dos trozos aislados pierden su coordinación.

La dirección en que se efectúa la contracción ciliar parece ser una característica predeterminada que depende también del citoplasma subyacente. Cuando se extirpa un trozo del epitelio de la faringe de rana y se lo reimplanta con una orientación invertida, el movimiento subsiste pero en dirección contraria a la del resto del epitelio intacto.

Las contracciones de los cilios son generalmente muy rápidas (10 a 17 por segundo en la faringe de la rana). El análisis del movimiento ha sido facilitado por el empleo de la estroboscopia y de la cinematografía ultrarápida.^{20, 21}

El movimiento ciliar puede ser pendular, unciforme (en forma de garfio), infundibuliforme u ondulante. Los dos primeros se ejecutan en un solo plano. En el pendular, típico de los protozoarios ciliados, el cilio es rígido y el movimiento se realiza por flexión en su base; en cambio, en el movimiento unciforme,

el más común en los metazoarios, al contraerse el cilio se dobla y adquiere la forma de un garfio. En el infundibuliforme, el cilio o flagelo rota pasando por los tres planos del espacio y describe una figura cónica o en embudo, y en el ondulante, característico de los flagelos y membranas, hay ondas de contracción que parten del lugar de implantación y llegan hasta el extremo libre.

Desde el siglo pasado el movimiento ciliar y el flagelar han sido comparados con el del músculo. Al descubrirse mediante el microscopio electrónico la organización $9 + 2$, se propuso una ingeniosa hipótesis que implica la contracción coordinada y la propagación de impulsos a través de las distintas estructuras tubulares.²² Recientemente se sugirió que durante el movimiento ciliar los túbulos periféricos de uno de los lados del cilio se mueven con respecto a los del otro lado por un mecanismo de deslizamiento.²³ La mayor parte de los trabajos experimentales sobre movimiento ciliar intentaron establecer la participación del ATP en el proceso. Ya hemos mencionado que la actividad ATPásica está asociada con una proteína presente en los brazos de la subfibrilla A (dineína), la cual

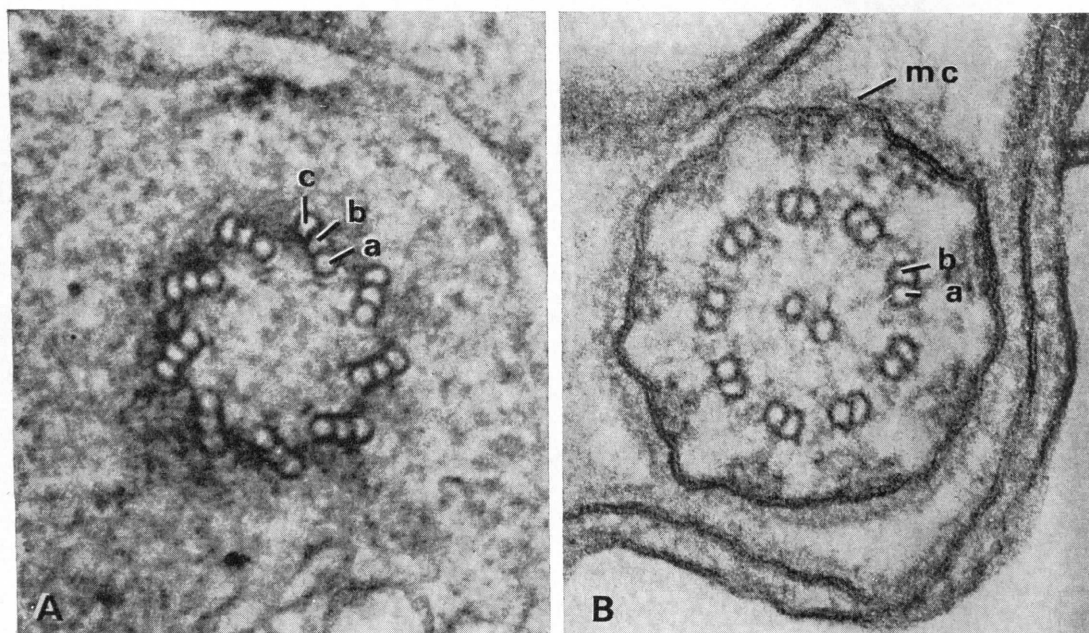


FIG. 22-4. A Corte trasversal de un centriolo de embrión de pollo. Obsérvense los 3 túbulos (*a*, *b* y *c*) en los 9 grupos periféricos del centriolo, la falta de los tubos centrales y la densidad de la pared centriolar. B Corte a través de un cilio. Compárese con la estructura del centriolo. *a* y *b* Corresponden a las subfibras A y B; *mc*, membrana ciliar (para mayores detalles véase la fig. 23-3), 50,000 $\times$. (Cortesía de J. André.)

constituye alrededor del 8 por ciento de las proteínas ciliares totales.

Diversos hallazgos revelan la importancia del adenosintrifosfato (ATP) en los cilios, flagelos y colas de espermatozoides. Se ha demostrado que la motilidad bacteriana, dependiente de flagelos filamentosos submicroscópicos compuestos por fibrillas simples, es estimulada por el ATP, que también induce la contracción muscular. Además, como en el caso del músculo, el movimiento de las bacterias es inhibido específicamente por los inhibidores tiólicos, que bloquean a los grupos $-SH$ presentes en los flagelos.²⁴ En modelos

de cilios, flagelos y colas de espermatozoides extraídos con glicerina, el agregado de ATP produce una actividad rítmica que se mantiene algunos minutos y aun horas.^{25, 26}

Estos experimentos indican que el mecanismo del movimiento ciliar está localizado en las fibrillas de la vaina ciliar y que la fuente de energía es probablemente el ATP.

Derivados ciliares

Los estudios sobre la estructura submicroscópica de los conos y bastones retinianos pusieron de relieve que la conexión fibrosa corta

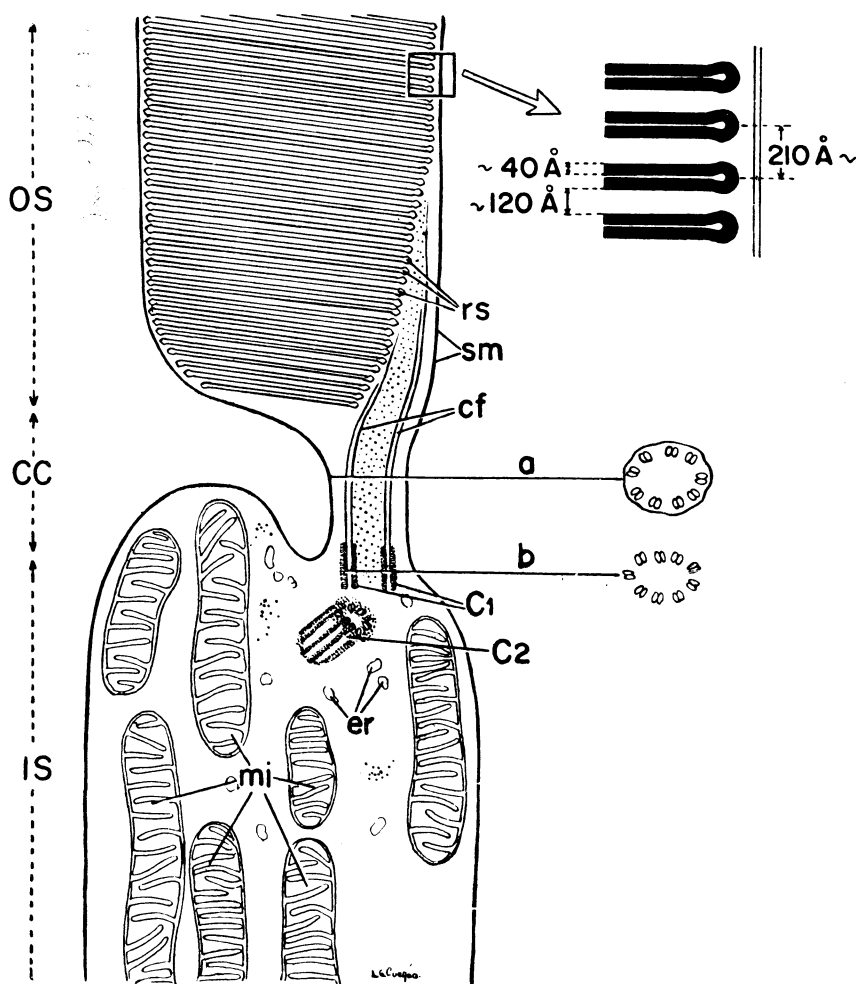


FIG. 22-5. Esquema de la ultraestructura de un bastón retiniano de conejo con: el segmento externo, OS, el cilio de conexión, CC, y el segmento interno, IS. *a* y *b* Cortes transversales del cilio y del centriolo, respectivamente; *C*₁, *C*₂, centriolos; *er*, retículo endoplásmico; *mi*, mitocondria; *cf*, filamentos ciliares; *sm*, membrana celular; *rs*, sacos del bastón. En el recuadro se observa con mayor aumento la estructura de los sacos y las dimensiones de las partes. (De De Robertis.)

existente entre los segmentos externo e interno es de naturaleza ciliar.

En los cortes trasversales de ese *cilio de conexión* se advierte la presencia de 9 pares de filamentos semejantes a los observados en los cilios (fig. 22-5).²⁷ Los filamentos del cilio de conexión salen de uno de los centriolos, mien-

tras que el otro se dispone perpendicularmente. El segmento externo de los bastones está constituido por muchas cisternas con membranas dobles, superpuestas como una pila de monedas.

Sobre la base de los estudios clásicos sobre la histogénesis de la retina se había formu-

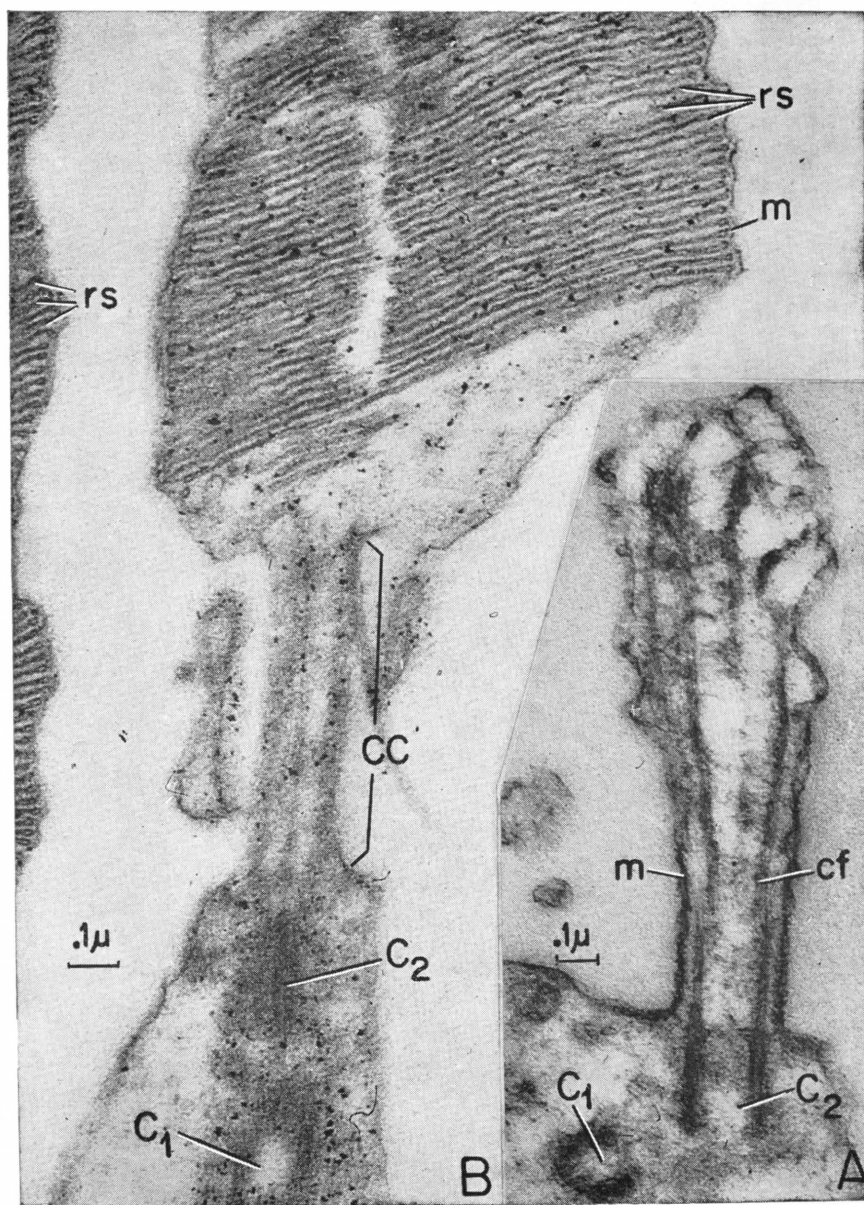


FIG. 22-6. A Fotomicrografía electrónica de un cilio primitivo en la retina de un ratón de 8 días. m Membrana ciliar; cf, fibrillas ciliares; C_1 y C_2 , centriolos. 72,000 $\times$. B Fotomicrografía electrónica del bastón de un ejemplar adulto. Se evidencia el segmento externo con los sacos del bastón (rs) y la membrana externa; el cilio de conexión (CC) y los centriolos basales (C_1 y C_2). 62,000 $\times$. (De De Robertis y Lasansky.)

lado la hipótesis de que los segmentos externos de los conos y bastones podían formarse a partir de un cilio. Esta presunción fue confirmada por la microscopia electrónica.²⁷ La primera etapa consiste en la aparición de un cilio primitivo que se proyecta a partir de un ensanchamiento del citoplasma, el cual constituye el esbozo del segmento interno (figuras 22-6 y 22-7). El cilio contiene los 9 pares de filamentos y los dos centríolos basales. El extremo apical está ocupado por un material vesicular. En una segunda etapa hay un gran ensanchamiento de la región apical del cilio, debido a la aparición de múltiples vesículas y cisternas que constituyen los sacos primitivos (fig. 22-7). En la formación de éstos participa la membrana superficial, probablemente por la influencia "inductora" del cilio. Este efecto se produce sólo en un lado, dando como resultado el desarrollo asimétrico del segmento externo. El tercer estadio incluye el remodelamiento y reorientación de los sacos, que se colocan en su posición trasversal definitiva. La parte proximal del cilio primitivo permanece sin diferenciarse y constituye el cilio de conexión del adulto (figura 22-7).

Otras estructuras han sido también reconocidas como derivados ciliares. Así, las llamadas células en corona del saco vasculoso, que se encuentran en el tercer ventrículo de los peces, presentan cilios modificados cuyos ex-

tremos ensanchados están llenos de vesículas.²⁸ Asimismo, las células sensoriales primitivas del ojo pineal de ciertos reptiles tienen una estructura ciliar.^{29, 31}

Origen de los cilios y de los cuerpos basales (centríolos)

Este importante problema se relaciona con el de los centríolos y cuerpos basales (o quinetosomas) como posibles organoides semiautónomos de la célula (la misma consideración se hizo en el caso de las mitocondrias y cloroplastos, en los capítulos 11 y 12, respectivamente). El aislamiento de quinetosomas en *Tetrahymena* evidenció la existencia de ARN y ADN,³² y su capacidad para llevar a cabo síntesis proteica. Una prueba más directa de que los centríolos poseen ADN se obtuvo con el colorante fluorescente naranja de acridina y mediante la incorporación de timidina-³H, seguida del tratamiento con ADNasa.^{33, 34} Se calcula que cada quinetosoma contiene aproximadamente 2×10^{16} g de ADN, cantidad semejante a la que se encuentra en las mitocondrias. Estos hallazgos reactualizan la posibilidad de síntesis de proteínas ciliares, es decir, si dependen o no del ADN y ARN centriolares. Los primeros citólogos reconocieron que el desarrollo de los cilios y flagelos estaba directamente vinculado con la presencia de centríolos. Los flagelos pueden ser extirpados y aun así regenerarse. En *Chlamydomonas*, por ejemplo, la velocidad de crecimiento es de $0,2 \mu$ por minuto.³⁵ Los estudios sobre el origen de los centríolos y quinetosomas se vieron dificultados por el pequeño tamaño de estas estructuras. Los microscopistas ópticos pensaron que los centríolos se originaban por división de los preexistentes, y que poseían una continuidad genética comparable a la de los cromosomas. Las observaciones con el microscopio electrónico no pre-

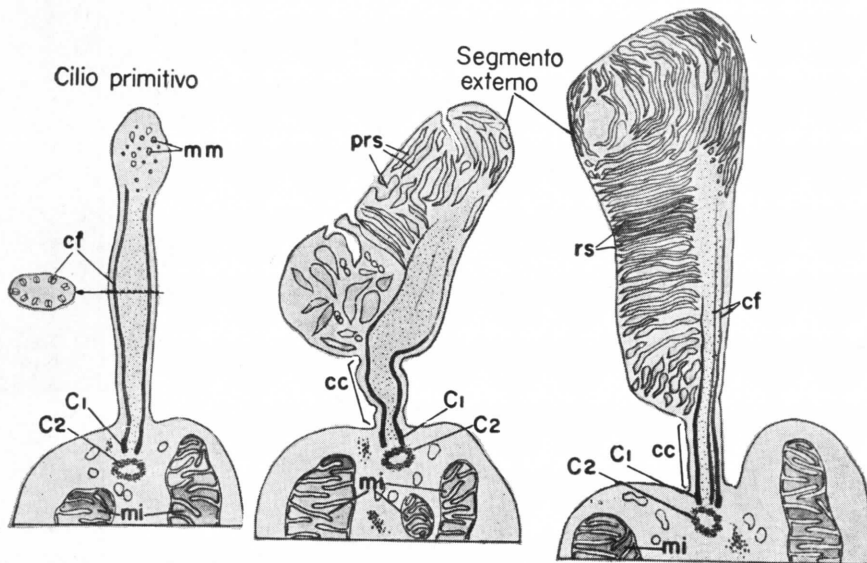


FIG. 22-7. Esquema de la diferenciación del segmento externo del bastón a partir del cilio primitivo. (De De Robertis.)

mitieron confirmar ese proceso de división. Además de la ultraestructura de los centriolos, descrita en el capítulo 13, este instrumento hizo posible identificar otras formaciones relacionadas,^{36, 37} como los cuerpos *pericentriolares* o “satélites”, masas de alrededor de 700 Å adheridas a veces a la pared del centriolo (fig. 13-6). Esta última configuración ha sugerido un proceso de brotación, aunque probablemente no sea éste el verdadero mecanismo y lo que ocurre es la “inducción” de un centriolo por otro, según sucede en cilios y flagelos.

Existen actualmente evidencias de que los centriolos pueden ser generados por dos mecanismos diferentes.^{38, 40} El primero tiene lugar en centriolos destinados a constituir husos mitóticos o cilios sencillos, y en este caso se originan directamente de la pared del centriolo preexistente. Los *centriolos hijos* se pre-

sentan al principio como estructuras anulares (*pro-centriolos*; fig. 22-8), que luego se alargan para formar cilindros. Los grupos triples de túbulos provienen de elementos simples o dobles que aparecen en la base del pro-centriolo. Cuando alcanzan la mitad de su crecimiento definitivo, los centriolos hijos son liberados en el citoplasma, donde completan su maduración. En general se sintetiza un solo centriolo hijo por vez, pero excepcionalmente puede formarse más de uno.⁴⁰

El otro mecanismo se verifica en centriolos que van a transformarse en quinetosomas, como ocurre en los epitelios ciliados. Aquí se organizan progresivamente a partir de un material precursor fibrogranular localizado en el citoplasma apical.^{40, 41} Los centriolos recién formados se alinean por debajo de la membrana plasmática apical. Cada centriolo puede

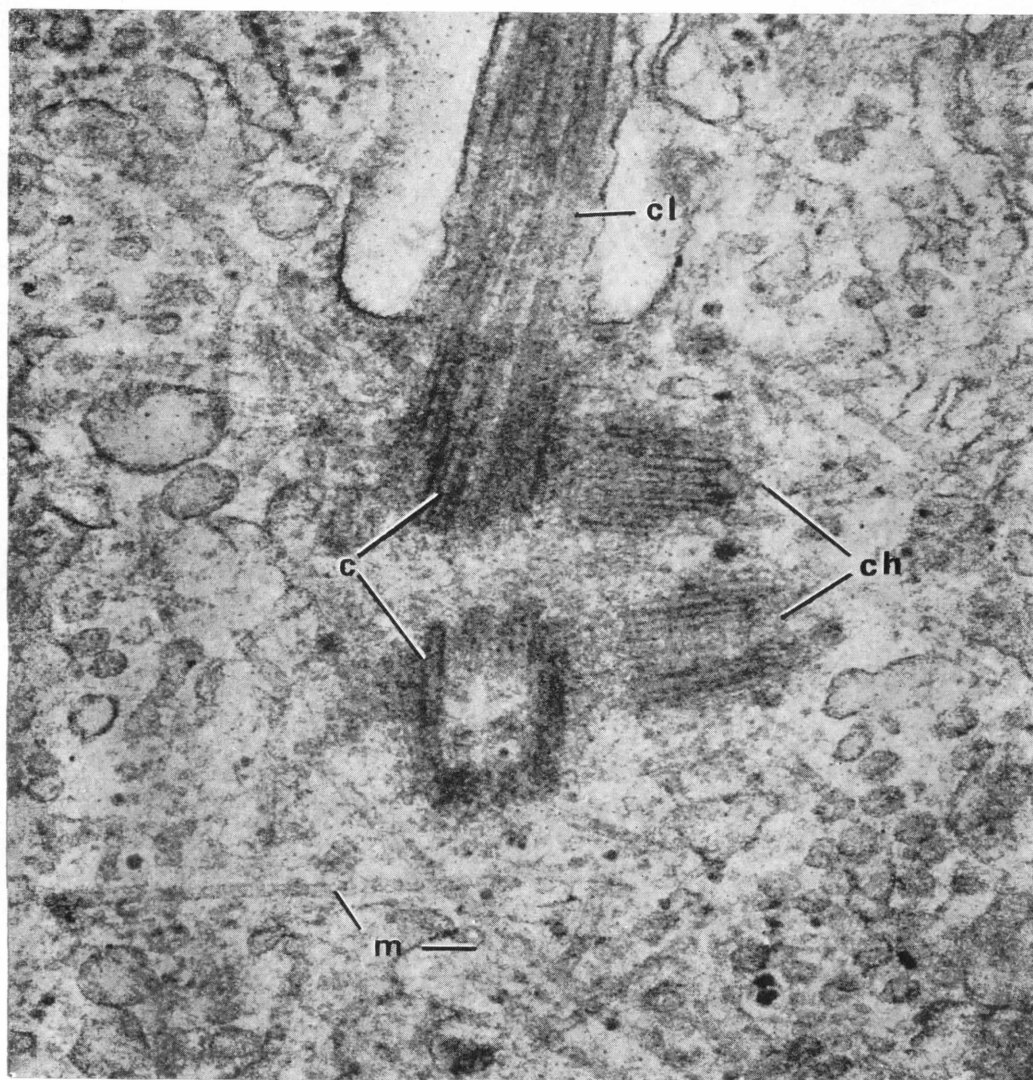


FIG. 22-8. Fotomicrografía electrónica del páncreas de embrión de pollo, en la que se observa la duplicación de los centriolos. *c* Los dos centriolos; *ch*, centriolos hijos; *cl*, cilio; *m*, microtúbulos. 50,000 ×. (Cortesía de J. André.)

producir satélites de sus lados, una raíz de su base y un cilio de su ápice. El desarrollo del cilio comienza con la aparición de una vesícula que se adhiere al extremo distal del centriolo. La vaina ciliar en crecimiento invagina la pared vesicular, que constituye una vaina temporaria hasta que aparezca la definitiva. En muchas células epiteliales pueden observarse cilios cortos encapsulados dentro de vesículas.⁴²

En el capítulo 13 se mencionó la correlación existente entre la duplicación del centriolo y el ciclo mitótico, por un lado, y la formación del huso, por el otro.

En resumen: la microscopia electrónica de los centriolos ha revelado que poseen una estructura tubular específica, que no se dividen y que se encuentran en relación con otras estructuras tubulares (véase Microtúbulos). Esto último sugiere que su función pueda ser la de regular la síntesis y organización de los microtúbulos dentro del citoplasma.

MICROTÚBULOS

Las estructuras microtubulares se distribuyen en el citoplasma de numerosos tipos de células. Son morfológicamente semejantes a las que existen en los cilios y flagelos, y parecen tener importancia en ciertas funciones celulares como la división, las corrientes citoplásmicas, el transporte intracelular y, posiblemente, la contractilidad general del citoplasma. La mayor parte de los microtúbulos son muy lábiles y no resisten los efectos de agentes fijadores como el tetróxido de osmio. Por ello, sólo a partir de 1963, con la introducción del glutaraldehído como fijador para microscopia electrónica, pudo reanudarse el estudio de estas estructuras.⁴³

Las primeras observaciones de estructuras tubulares fueron realizadas por De Robertis y Franchi⁴⁴ en el axoplasma separado de fibras nerviosas mielínicas (fig. 24-5), donde los *neurotúbulos* aparecen como elementos cilíndricos alargados, no ramificados, de 200 a 300 Å de diámetro y de longitud indefinida. Los microtúbulos se observaron posteriormente en gran variedad de células animales.⁴⁵⁻⁴⁹

Los microtúbulos citoplásmicos son rectilíneos y de tamaño uniforme; tienen un diámetro de cerca de 240 Å y una longitud de varios micrones. En corte trasversal presentan una configuración anular, con una pared densa y un centro claro. Cada microtúbulo está rodeado de una zona de baja densidad electrónica carente de ribosomas u otras partículas. En el capítulo 12 se hizo referencia a la orientación especial de los microtúbulos en células vegetales y su posible relación con el depósito de material en sus paredes.

La pared del microtúbulo se halla consti-

tuida por estructuras filamentosas individuales, lineales o espirales, de unos 50 Å de diámetro, compuestas a su vez por subunidades.⁵⁰ En corte trasversal se ven alrededor de 13 subunidades separadas por una distancia de 45 Å de centro a centro. Esta organización es muy similar a la que se describió antes en los túbulos de cilios y flagelos (fig. 22-3), y también en este caso el uso de coloración negativa permitió evidenciar que poseen una luz y una estructura compuesta por subunidades en su pared.⁵¹ En los microtúbulos del huso de células de levadura, la pared parece estar formada por subunidades con disposición helicoidal.⁵² Los microtúbulos generalmente se observan como "huecos", careciendo de densidad electrónica en su interior (figura 22-8); sin embargo, en ocasiones se han divisado puntos densos o bastones en la zona central de algunos de ellos⁵³ (fig. 24-6). En los nematocistos de la hidra existe aparentemente conexión entre las vacuolas del Golgi y los microtúbulos,⁴⁸ relación que también fue advertida en células nerviosas.⁵⁴ Para información más detallada acerca de la morfología de los microtúbulos, véase^{55, 57}.

Acción de la colchicina sobre los neurotúbulos

Aunque todos los microtúbulos estudiados tienen aproximadamente las mismas características morfológicas, es evidente que difieren en sus propiedades. Por ejemplo, los microtúbulos de cilios y flagelos son mucho más resistentes a diversos tratamientos; en cambio, los que constituyen las fibras del huso y los que se encuentran en el citoplasma suelen ser estructuras lábiles y transitorias. Los microtúbulos citoplásmicos desaparecen a 0°C y al ser tratados con colchicina, que provoca igualmente la disolución del aparato mitótico. Esta droga se une específicamente a la proteína 6 S, un monómero precursor de los microtúbulos,⁵⁸ e impide el armado de subunidades destinadas a constituirlos. Aprovechando la capacidad de unión de la colchicina, se aisló del cerebro de mamíferos una proteína que, presumiblemente, es la subunidad de los neurotúbulos.⁵⁹ La proteína del aparato mitótico posee una composición similar a la de las proteínas flagelares y ciliares,⁶⁰ y se asemeja notablemente a la actina muscular en su contenido en aminoácidos.^{61, 62}

Las temperaturas bajas y las presiones elevadas sobre las células tienden a desviar el equilibrio hacia la forma monomérica de la proteína, con desintegración de los microtúbulos. Ni la colchicina ni las bajas temperaturas alteran los túbulos de cilios y flagelos, mucho más resistentes; pero como ya se ha mencionado, éstos pueden desintegrarse por la acción de agentes quelantes, soluciones salinas o tratamientos con enzimas proteolíticas. Utilizando varios de estos criterios, se han reconocido cuatro clases de microtúbulos: 1) microtúbulos citoplásmicos; 2) túbulos accesorios de las espermátidas y pares centrales del complejo 9 + 2; 3) túbulos B, y 4) túbulos A

(del complejo 9 + 2 de cilios y flagelos). La estabilidad de los microtúbulos aumenta progresivamente de la clase 1 a la 4.⁵⁶

Funciones de los microtúbulos

Contracción y movilidad. Es difícil en el presente resumir la función de los microtúbulos. En el caso de cilios, flagelos, huso mitótico y citoplasma contráctil de protozoarios (pie de *Vorticella*, por ejemplo) los microtúbulos están relacionados con la contracción.

Los microtúbulos constituyen aproximadamente el 10 por ciento de la proteína del huso⁶³ y son responsables de su birrefringencia y de los rayos astrales.⁶⁴ En la citocinesis se observan ondas peristálticas a lo largo del pedículo que vincula a las dos células hijas, encontrándose en él numerosos microtúbulos. Los husos mitóticos extraídos con glicerol se contraen por la acción del ATP.⁶⁵

La relación entre microtúbulos y motilidad celular ha sido estudiada en células HeLa tratadas con colchicina para provocar la disolución de esas estructuras. Sin embargo, se mantienen las siguientes formas de movimiento: a) agitación de membrana; b) endocitosis (véase cap. 21); c) adherencia a la superficie, y d) extensión de microvellosidades. Por tanto, después de la destrucción de los microtúbulos, sólo es inhibido el movimiento saltatorio de partículas.⁶⁶ En las células tratadas con colchicina, los microtúbulos se transforman en estructuras filamentosas delgadas, que pueden estar en correspondencia con los tipos de movimientos persistentes.

Función mecánica. La forma de algunas prolongaciones o protuberancias celulares se halla en relación con la orientación y distribución de los microtúbulos. Éstos han sido considerados como la armazón (*citoesqueleto*) que tiene a su cargo el moldeado de la forma celular y la redistribución de su contenido.

Circulación y transporte. Los microtúbulos pueden actuar también como un "sistema microcirculatorio" para el *transporte* de pequeñas moléculas en su interior, y más probablemente, entre ellos, limitando canales en el citoplasma. Disposiciones estacionarias de los microtúbulos son susceptibles de proporcionar la fuerza motora para las corrientes citoplásmicas (Porter, 1966).

Un ejemplo muy interesante es el del protozoo *Actinosphaerium* (heliozoo), que

emite pseudópodos largos y delgados dentro de los cuales emigran partículas citoplásmicas en una y otra dirección. Los pseudópodos contienen microtúbulos (alrededor de 500) dispuestos de manera helicoidal. Cuando estos protozoarios son sometidos al frío⁶⁷ o a presiones elevadas, los pseudópodos desaparecen y los microtúbulos se despolimerizan (algunos de estos fenómenos serán tratados nuevamente al considerar el movimiento ameboide). Otro ejemplo interesante de la conexión entre los microtúbulos y el transporte de partículas lo proporcionan los melanóforos, en los cuales los gránulos de melanina se mueven centrífuga y centrípetamente, ante diferentes estímulos, entre canales creados por la presencia de microtúbulos en la matriz citoplásmica. Aquí, como en otros casos, es posible que los microtúbulos guíen la dirección del movimiento.⁶⁸

Diferenciación celular. Los ejemplos citados y muchos otros (Porter, 1966) indican que los microtúbulos pueden también desempeñar un papel en los *cambios localizados de forma* que acontecen en el curso de la diferenciación celular.

Por ejemplo, el alargamiento de las células durante la invasión de la placoda del cristalino se acompaña de la aparición de numerosos microtúbulos.⁶⁹ Otro caso interesante es el de las transformaciones morfogénicas suscitadas durante la espermiogénesis de las aves. El notable alargamiento del núcleo de la espermátida ocurre simultáneamente con la producción de microtúbulos que se arrollan en torno al núcleo, siguiendo una dirección perpendicular a su eje, y que poseen una disposición helicoidal doble. La formación microtubular desaparece al completarse el alargamiento nuclear y es reemplazada por otros sistemas de microtúbulos que corren en forma axil.⁷⁰

Corriente citoplásmica

La *corriente citoplásmica* o *ciclosis* es fácilmente percibida en células vegetales, en las que el citoplasma se halla reducido a una capa adyacente a la pared celulósica y a finas trabéculas que cruzan la gran vacuola central. Se aprecian en ellas corrientes continuas que desplazan a los cloroplastos y demás gránulos citoplásmicos. En los protozoarios ciliados, como el *Paramecium*, hay movimientos similares, aunque más lentos, que

trasladan a las vacuolas digestivas desde el sitio de ingestión al de excreción. La circulación intracelular se manifiesta también en muchas células de animales superiores, particularmente en cultivo de tejidos. Su observación se mejora empleando el microscopio de fase, el condensador de campo oscuro o la cinematografía. La división cariocinética, que comporta el complejo desplazamiento del centro celular, los cromosomas y otros orgánoides celulares, está incluida en este tipo de movimiento endocelular.

El trabajo experimental clásico sobre ciclosis fue realizado en células vegetales. En ese sentido son particularmente apropiadas las células cilíndricas de *Nitella*, que tienen una capa citoplásmica de unos 15 μ , la cual rodea a una vacuola central de 0.5 mm $\times$ 10 cm. El movimiento se produce a lo largo del eje longitudinal y en la parte más interna y líquida de la capa protoplásmica. En algunas células vegetales la ciclosis se inicia por la influencia de un estímulo químico (*quimiodinesis*) o luminoso (*fotodinesis*).

La corriente citoplasmática es influida por la temperatura (la actividad máxima se verifica a una temperatura óptima), la acción de

los iones y las variaciones del pH. En cambio, puede continuar en ausencia de oxígeno. Las lesiones mecánicas, el shock eléctrico y los anestésicos son susceptibles de detener la ciclosis, en tanto que algunas auxinas (hormonas vegetales) aumentan su velocidad. En general, todos los factores que disminuyen la viscosidad celular aumentan la velocidad de la corriente protoplásmica y viceversa. Se ha observado que el movimiento disminuye progresivamente en células sometidas a la presión hidrostática, al mismo tiempo que el protoplasma se vuelve más líquido.⁷¹

En apoyo de la posible participación de los microtúbulos en las corrientes citoplásmicas está el hecho de que se encuentran muchos haces de microtúbulos en el citoplasma adyacente a la vacuola central de las células vegetales (*hojas de Caulerpa*). Se ha sugerido que los microtúbulos proporcionan una verdadera armazón sobre la cual se genera la fuerza impulsora del movimiento.⁷²

En *Nitella* se observaron microtúbulos por debajo de la membrana plasmática, a cierta distancia de la corriente citoplásmica. No obstante, en la interfase entre el endoplasma en movimiento y el ectoplasma estacionario se visualizan haces de filamentos delgados (50 Å) orientados en forma paralela a la dirección de la corriente. Por ello, se supuso que estos filamentos, y no los microtúbulos, eran los respon-

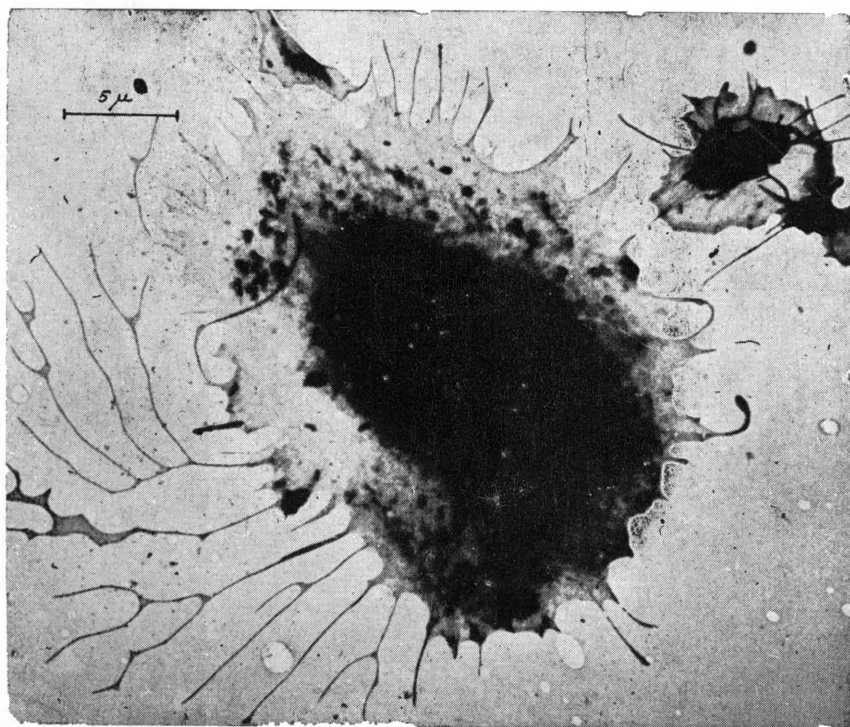


FIG. 22-9. Fotomicrografía electrónica de un leucocito polimorfonucleado. 3000 $\times$.
(De De Robertis.)

sables del desarrollo de la fuerza motora de la ciclo-sis en el alga. El mismo fenómeno se ha descrito en ciertos hongos (véase más adelante).⁷³

MOVIMIENTO AMEBOIDE

En el movimiento ameboide la célula cambia de forma activamente enviando prolongaciones citoplásmicas, denominadas *seudópodos*, por cuyo interior fluye luego el resto del protoplasma. Esta forma especial de locomoción puede observarse fácilmente en las amebas, aunque también existe en muchos tipos celulares. Basta colocar entre un portaobjetos y un cubreobjetos una gota de sangre para ver que los leucocitos, al principio esféricos, modifican su forma, emiten pseudópodos y se desplazan. En los cultivos de tejidos todos los elementos mesenquimatosos, endoteliales, epiteliales, etcétera, se pueden liberar del resto del tejido y desplazarse activamente, formando la zona de migración.

En algunos casos, las células deben experi-

mentar un proceso de *desdiferenciación* para adquirir esta forma ameboide activa. Ello sucede en los epitelios, donde desaparecen los desmosomas que mantienen adheridas a las células. Estos cambios ocurren también *in vivo*. Por ejemplo, en la reparación de los epitelios, las células se liberan y deslizan activamente hacia el fondo de la herida. En un proceso inflamatorio, los leucocitos salen de los vasos (*diapédesis*) por movimientos ameboides activos y se desplazan hacia el foco de infección.

El movimiento ameboide tiene lugar cuando las células están adheridas a algún sustrato. En su forma más simple se trata de una corriente citoplásmica que determina el desplazamiento continuo de un cuerpo tubular. Algunas amebas son predominantemente *monopódicas* (un pseudópodo); otras pueden ser temporaria o permanentemente *polipódicas*. La forma de los pseudópodos varía entre un *lobopodio* macizo y un delgado *filopodio* fila-

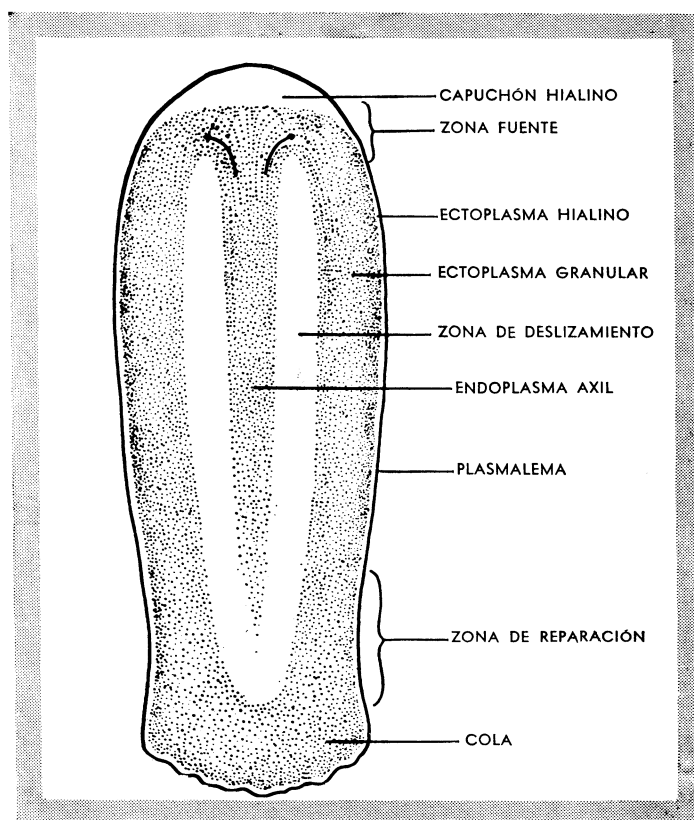


FIG. 22-10. Un nuevo esquema de la estructura de la ameba y del movimiento ameboide basado sobre estudios de flujo citoplásmico. Se propone una nueva terminología para las diferentes regiones del citoplasma de la ameba. (De R. D. Allen.)

mentoso o ramificado (fig. 22-9). En los foraminíferos estas finas prolongaciones se anastomosan y constituyen *reticulopodios*. Como demuestran los clásicos estudios de Mast, el protoplasma de la ameba tiene un ectoplasma claro que se expande considerablemente hacia el extremo del pseudópodo formando la cubierta hialina.

En la ameba, de acuerdo con estudios más recientes, se reconoce la organización ilustrada en la figura 22-10. El endoplasma axil está rodeado de una zona de deslizamiento en la cual las partículas se mueven con mayor libertad. En el extremo que avanza se halla la cubierta hialina, e inmediatamente detrás, "la zona de origen", a cuyo nivel el endoplasma axil se contrae activamente y fluye por debajo del tubo ectoplásmico.

En el extremo opuesto se encuentra la *prolongación caudal*, también denominada *cola (uroide)*, y cerca de ella la *zona de reparación*, donde el endoplasma se repara a partir de las paredes del ectoplasma en el tercio posterior de la célula.^{74, 75}

En los mixomicetos (fig. 22-11) hay varios pseudópodos que se mueven a veces en diferentes direcciones. El plasmodio presenta un movimiento de naturaleza pulsátil cuya fuerza es susceptible de ser medida y registrada (fig. 22-12).

Aplicando con el aparato una presión suficiente se evita el movimiento.

Con dicho sistema⁷⁶ puede observarse que cuando la mitad del plasmodio se halla en una solución conteniendo ATP, la fuerza motora desarrollada es mucho mayor. En este caso la fuente primaria de energía proviene de la glucólisis, que es rápidamente abolida por los inhibidores específicos; en cambio, los inhibidores de la fosforilación oxidativa ejercen poco efecto sobre aquélla.

De los mixomicetos se aisló una proteína contráctil, denominada *mixomiosina*, sobre la cual podría actuar el ATP.⁷⁷ Esta proteína tiene una actividad ATPásica estimulada por el Ca^{++} , aunque su peso molecular es menor que el de la actomiosina muscular. Con el microscopio electrónico se ha descubierto que está constituida por filamentos de 70 Å de largo, localizados en el ectoplasma del hongo.⁷⁸ Los filamentos parecen ser estructuras transitorias, que se forman un momento antes de la contracción y que desaparecen durante la fase de relajación.

La velocidad del desplazamiento varía en las distintas amebas entre 0.5 y 4.6 μ por segundo. En los leucocitos neutrófilos es aproximadamente de 0.58 μ por segundo. La temperatura u otros factores del medio modifican la velocidad. El aporte deficiente de oxígeno no detiene el movimiento, pero lo vuelve más lento. Para este tipo de locomoción el calcio es indispensable: si se coloca una ameba en presencia de una sustancia que sustrae el calcio (como es un oxalato),

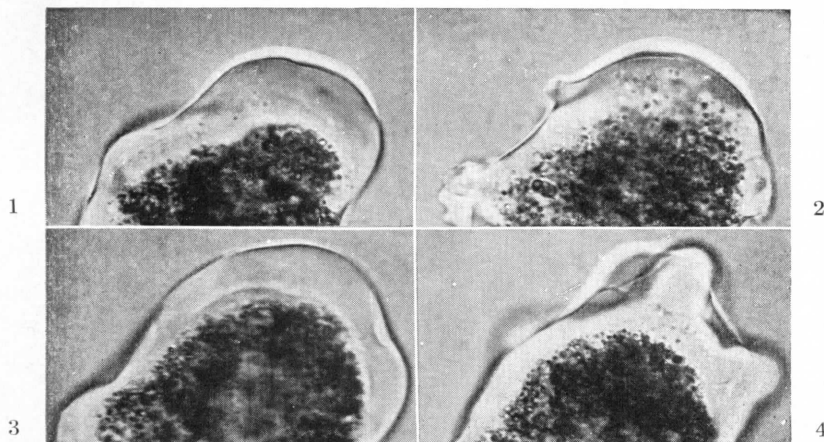


FIG. 22-11. Fotomicrografías tomadas con intervalos de 10 segundos sin mover la cámara del extremo ameboide de un mixomiceto. La línea basal permanece constante, de manera que se puede medir el avance y la retracción. 1 Cubierta hialina en el extremo de un pseudópodo que avanza; se observa el contorno uniforme y prominente de la capa del gel granuloso. 2 El mismo extremo, 40 segundos más tarde; la delgada capa hialina se ha desintegrado y los gránulos penetran en ella. 3 El mismo extremo, 20 segundos después; se ha producido la gelificación de la zona periférica del protoplasma granular y la formación de una nueva cubierta hialina. 4 El mismo extremo, 30 segundos más tarde; retracción del pseudópodo y cubierta hialina irregular. (Cortesía de W. Lewis y de la Editorial Iowa State College: *The Structure of Protoplasma*.)

el movimiento se detiene. El ión potasio tiene un efecto antagonista con respecto al del ión calcio. Una lesión mecánica grave, el shock eléctrico o la radiación ultravioleta causan inmediatamente una retracción de los seudópodos y la célula adquiere forma esférica.^{75, 79, 80}

Otro factor importante en el movimiento ameboide es la *adherencia a un soporte sólido*. Cuando una ameba flota libremente en el medio líquido puede emitir algunos seudópodos pero no se desplaza; sólo si se adhiere a una superficie sólida, comienza este tipo de locomoción. En los cultivos de tejidos, las fibras del coágulo sirven de sostén a las células ameboides; en el tejido conectivo, las fibras colágenas o reticulares pueden desempeñar esa función.

Entre los factores que determinan el movimiento ameboide es necesario considerar las sustancias que influyen sobre la motilidad por medio de la atracción o repulsión de las células. Esta propiedad, que se denomina *quimiotactismo* (quimiotaxis), tiene gran importancia en los mecanismos de defensa del organismo, especialmente durante la inflamación.

Mecanismos del movimiento ameboide

Las teorías actuales sobre el movimiento ameboide se basan en el conocimiento moderno de la estructura de la matriz celular (véase cap. 9) y, particularmente, en la consideración de que ésta contiene un retículo de moléculas proteicas unidas entre sí por di-

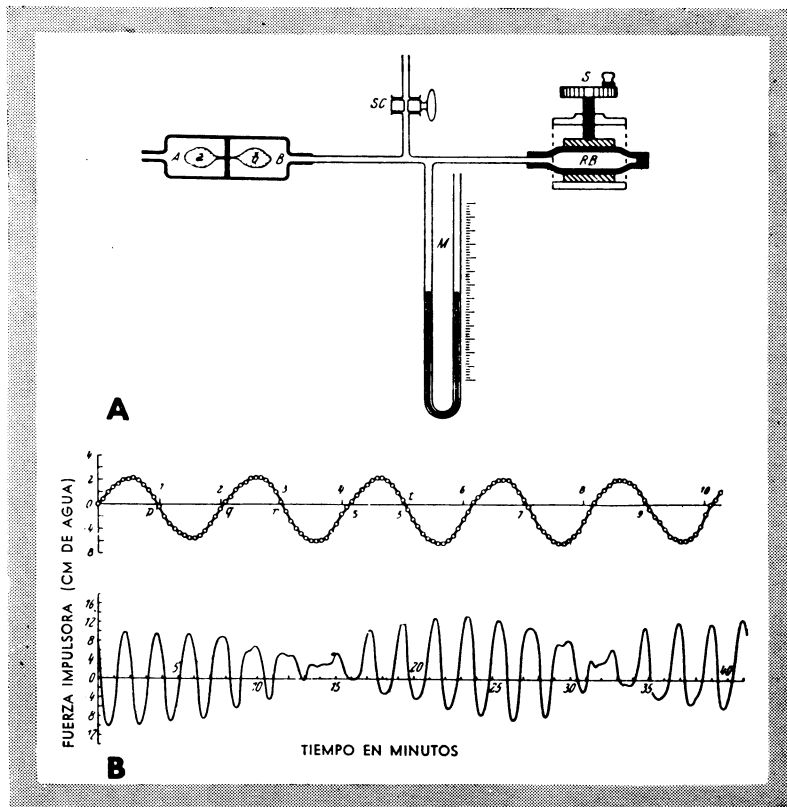


FIG. 22-12. A Esquema del dispositivo para medir la fuerza de la corriente protoplásmica en el plasmodio de un mixomiceto. Obsérvese la doble cámara (A, B) con los mixomicetos (a, b) en comunicación por un pequeño orificio entre ellas. M Manómetro lleno de agua; SC, llave; S, tornillo para controlar la presión aplicada al bulbo (RB). B Registro de la fuerza en centímetros de agua. Obsérvese la onda pulsátil en condiciones normales. La línea superior es un registro en el que se aprecian todos los puntos inscritos varias veces por minuto. En el registro de la línea inferior los puntos se han omitido y la abscisa ha sido comprimida con el propósito de ofrecer datos por un período de tiempo más prolongado. Empleando este equipo, se pueden estudiar los efectos de la temperatura, de los anestésicos y de diversos agentes nocivos sobre la onda. (De N. Kamiya.)

ferentes tipos de ligaduras cruzadas. Modificando esas fuerzas y el grado de plegamiento o longitud de las cadenas proteicas, pueden producirse trasformaciones sol-gel y la contracción en una región localizada del protoplasma.⁸¹

La inyección del ATP produce en la ameba contracción y licuación del gel cortical. Si se realiza la microinyección en la cola, la ameba aumenta su velocidad de desplazamiento; si se hace la inyección en el pseudópodo que avanza, la dirección del movimiento se invierte.⁸²

El empleo de la microscopia de interferencia constituyó un interesante método de investigación para encarar el problema. Como se explicó en el capítulo 6, este método permite medir la concentración de materia seca (proteína) y de agua mediante la determinación de los índices de refracción y los cambios de fase. En una ameba en movimiento, la concentración de proteínas citoplásmicas es significativamente mayor en la cola, habiéndose demostrado que esta diferencia no depende de la actividad de la vacuola contráctil que extrae agua de la cola.⁸³

La mayor parte de los datos favorecen el punto de vista que sostiene una contracción activa como fuerza motora del movimiento ameboide y de las corrientes citoplásmicas. Las opiniones están en cambio divididas en lo que respecta al sitio de la contracción. Mientras que algunos investigadores consideran la región posterior del tubo ectoplásmico como la más activa, otros atribuyen mayor importancia a la "zona-fuente" en el extremo que avanza de la ameba.⁷⁵

En amebas extraídas con glicerol pueden inducirse contracciones muy acentuadas mediante la adición de ATP y Mg^{++} , y se ha logrado aislar de ellas una ATPasa semejante a la miosina.⁸⁴ Ya fue mencionada la importancia de los microtúbulos en la formación de los pseudópodos delgados de los heliozoarios.

Con el microscopio electrónico también se observaron fibras citoplásmicas (probablemente microtúbulos) en las células ameboides de las larvas de abejas.⁸⁵

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Adelman, M. R., Brisy, C. G., Shelanski, M. L., Weisenberg, R. C. and Taylor, E. W.: (1968) Cyttoplasmic filaments and tubules. *Fed. Proc.*, 27:1186.
Allen, R. D.: (1961) Ameboid movement. In: *The cell*, vol. 2, p. 135. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.

Allen, R. D.: (1962) Ameboid movement. *Scient. Amer.*, 206 (Febr.):112.
Fawcett, D.: (1961) Cilia and flagella. In: *The cell*, vol. 2, p. 217. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
Kamiya, N.: (1960) Physics and chemistry of protoplasmic streaming. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 11: 323.
Marsland, D.: (1956) Protoplasmic contractility in relation to gel structure: temperature and pressure experiments on cytokinesis and ameboid movement. *Int. Rev. Cytol.*, 5:199.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Fawcett, D.: (1961) Cilia and flagella. In: *The cell*, vol. 2, p. 217. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
2. Grigg, G. W. and Hodge, A. J.: (1949) *Aust. J. Sci. Res.*, ser. B., 2:271.
3. Manton, I., Clarke, B., Greenwood, A. E. and Flint, E. A.: (1952) *J. exp. Bot.*, 3:204.
4. Fawcett, D. W. and Porter, K. R.: (1954) *J. Morph.*, 94:221.
5. Afzelius, B.: (1959) *J. biophys. Biochem. Cytol.*, 5:269.
6. Gibbons, I. R. and Grimstone, A. V.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:679.
7. Gibbons, I. R.: (1967) In: *Molecular Organization and Biological Function*, p. 211. (Allen, J. M., ed.) Harper and Row, New York.
8. Allen, R. D.: (1968) *J. Cell Biol.*, 37:825.
9. Pease, D. C.: (1963) *J. Cell Biol.*, 18:313.
10. André, J. and Thiéry, J. P.: (1963) *J. Microscopic*, 2:71.
11. Grimstone, A. V. and Klug, A.: (1966) *J. Cell Sc.*, 1:351.
12. Satir, P. and Child, F.: (1962) *Biol. Bull*, 125: 390.
13. Randall, J. T. and Friedländer, M.: (1950) *Exp. Cell Res.*, 1:1.
14. Burgos, M. H. and Fawcett, D. W.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:223.
15. Watson, M. R. and Hopkins, J. M.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 28:280.
16. Gibbons, I. R.: (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 50:1002.
17. Henaud, F. L., Rowe, A. J. and Gibbons, I. R.: (1968) *J. Cell Biol.*, 36:7a.
18. Shelanski, M. L. and Taylor, E. W.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:549.
19. Sleight, M. A.: (1957) *J. exp. Biol.*, 34:106.
20. Dalhamm, T.: (1956) *Acta physiol. scand.*, 36, Suppl. 123:1.
21. Gray, J.: (1958) *J. exp. Biol.*, 35:96.
22. Bradfield, J. R. G.: (1955) *Symp. Soc. exp. Biol.*, 9:306.
23. Satir, P.: (1967) *J. gen. Physiol.* 50:241.
24. De Robertis, E. and Peluffo, C. A.: (1951) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 78:584.
25. Hoffmann-Berling, H.: (1956) In: *The cell, organism and milieu*, p. 45. (Rudnick, D., ed.) The Ronald Press, Co., New York.
26. Bishop, D. W.: (1958) *Nature*, 182:1638.
27. De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:319.
28. Porter, K. R.: (1957) *Harvey Lect.*, Ser. 51 (1955-1956), p. 175.

29. Eakin, R. M. and Wetfall, J. A.: (1959) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6:133.
30. Steyn, W.: (1969) *Nature*, 183:764.
31. Eakin, R. M.: (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 47:1084.
32. Seaman, G. R.: (1960) *Exp. Cell Res.*, 21:292.
33. Randall, J. and Disbruj, C.: (1965) *Proc. roy. Soc. B.*, 162:473.
34. Smith Sonneborn, J. and Plaut, W.: (1967) *J. Cell Sci.*, 2:225.
35. Lewin, R. A.: (1953) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56:1091.
36. Besis, M., Breton-Gorius, J. and Thiéry, J. P.: (1958) *Rev. Hémat.*, 13:363.
37. Bernhard, W. and de Harven, E.: (1958) *Proc. 4th Int. Conf. Electron Microscopy*, 2:217.
38. Gall, J. G.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10:163.
39. Mizukanni, I. and Gall, J. G.: (1966) *J. Cell Biol.*, 29:97.
40. Sorokin, S. P.: (1968) *J. Cell Sci.*, 3:207.
41. Dirksen, E. R. and Crocker: (1966) *J. Microscop.*, 5:629.
42. Martínez, P. and Drems, F. H.: (1968) *Z. Zellforsch.*, 87:46.
43. Sabatini, D. D., Bensh, K. and Barnett, R. J.: (1963) *J. Cell Biol.*, 17:19.
44. De Robertis, E. and Franchi, C. M.: (1953) *J. exp. Med.*, 98:269.
45. Grassé, P. P.: (1956) *Arch. Biol.*, 67:595.
46. Roth, L. E.: (1958) *J. Ultrastruct. Res.*, 1:223.
47. Roth, L. E.: (1959) *J. protozool.*, 6:107.
48. Slaughterback, M. C.: (1963) *J. Cell Biol.*, 18:367.
49. Slaughterback, M. C. and Porter, K. R.: (1963) *J. Cell Biol.*, 19:239.
50. Ledbetter, M. C. and Porter, K. R.: (1964) *Science*, 144:872.
51. Gall, J. G.: (1966) *J. Cell Biol.*, 31:639.
52. Moor, H.: (1967) *Protoplasma*.
53. Echandía, E. L. R., Piezzi, R. S. and Rodríguez, E. M.: (1968) *Ann. J. Anat.*, 122:157.
54. Pellegrino de Iraldi, A. and De Robertis, E.: (1968) *Z. Zellforsch.*, 87:330.
55. Porter, K. R.: (1966) In: *Principles of Biomolecular Organization Ciba Symp.*, p. 308. (J. A. Churchill, L. T. D., ed.) London.
56. Behnke, D. and Forer, A.: (1967) *J. Cell Sci.*, 2:169.
57. *Neuroscience Program Bul.* (1968) 6.
58. Borisky, G. G. and Taylor, E. W.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:535.
59. Weisenberg, R. C., Borisky, C. G. and Taylor, E. W.: (1968) *Biochemistry* (in Press).
60. Stephens, R. E.: (1968) *J. molec. Biol.*, 33:517.
61. Renaud, F. L., Rowe, A. J. and Gibbons, I. R.: (1968) *J. Cell Biol.*, 36:79.
62. Shelanski, M. L. and Taylor, E. W.: (1968) *J. Cell Biol.*, 38:304.
63. Bibring, T. and Baxandall, J.: (1968) *Science*, 161:377.
64. Inoué, S. and Sato, H. G.: (1967) *J. gen. Physiol.*, 50:suppl., p. 259.
65. Hoffmann-Berling, H.: (1958) *Biochem. biophys. Acta*, 27:247.
66. Freed, J. J., Bhisly, A. N. and Libowitz, M. M.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:46a.
67. Tilney, L. G. and Porter, K. R.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:327.
68. Bickle, D., Tilney, L. G. and Porter, K. R.: (1966) *Protoplasma*, 61:322.
69. Byers, B. and Porter, K. R.: (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 52:1091.
70. McIntosh, J. R. and Porter, K. R.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:153.
71. Osterhout, W. J. V.: (1951) *J. gen. Physiol.*, 34:519.
72. Sabnis and Jacobs, W. P.: (1967) *J. Cell Sci.*, 2:465.
73. Nagai, R. and Rebhun, L.: (1966) *J. Ultrastruct. Res.*, 14:571.
74. Allen, R. D.: (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 8:379.
75. Allen, R. D.: (1961) Ameboid movement. In: *The cell*, vol. 2:135. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
76. Kamiya, N.: (1959) *Protoplasmatologia*, 8:3a, 1.
77. Loewy, A. G.: (1952) *J. cell comp. Physiol.*, 40:127.
78. Wohlfarth-Bottermann: (1964) In: *Primitive motile systems in Cell Biology*, p. 79. (Allen, R. D. and Kamiya, N., eds.) Academic Press, New York.
79. Heilbrunn, L. V.: (1952) *An outline of general Physiology*. 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
80. Heilbrunn, L. V.: (1956) *The dynamics of living protoplasm*. Academic Press, New York.
81. De Bruyn, P. P. H.: (1947) *Quart. Rev. Biol.*, 22:1.
82. Goldaire, R. J. and Lorch, I. J.: (1950) *Nature*, 166:497.
83. Allen, R. D. and Rolansky, J. D.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:517.
84. Simard-Duquesne, N. and Couiller, P.: (1962) *Exp. Cell Res.*, 28:85, 92.
85. Du Praw, E. J.: (1965) *Develop. Biol.*, 12:53.

Biología molecular del músculo

La contractibilidad celular alcanza su máximo desarrollo en los diversos tipos de tejido muscular. La organización estructural del músculo está adaptada al acortamiento unidireccional durante la contracción. Debido a ello, las células musculares suelen ser alargadas y fusiformes. La matriz citoplásmica se halla sumamente diferenciada y la mayor parte del citoplasma está ocupada por fibrillas contráctiles. En el músculo liso las *miofibrillas* son homogéneas y birrefringentes; en cambio, en el músculo cardíaco y en el esquelético son estriadas y poseen zonas oscuras, birrefringentes (anisotrópicas), que alternan con otras claras e isotrópicas (fig. 23-1). En las células musculares sólo una pequeña parte del citoplasma —el *sarcomplasma*— mantiene su característica embrionaria. Se distribuye entre las miofibrillas y es particularmente abundante alrededor del núcleo.

El grado de diferenciación funcional de algunas células musculares puede ser tan elevado como para producir un trabajo equivalente a mil veces su propio peso y contraerse cien o más veces por segundo.

Las diferentes clases de células musculares se estudian en los textos de Histología y los tipos especiales de contracción en los tratados de Fisiología. Aquí analizaremos principalmente la organización macromolecular del músculo estriado y su relación con el trabajo de la contracción.

El músculo estriado del esqueleto está constituido por fibras cilíndricas que tienen entre 10 y 100 μ de diámetro y varios milímetros o centímetros de largo.

Esas enormes estructuras se originan en el embrión por fusión de varias células primordiales denominadas *mioblastos*.

Toda la fibra se halla rodeada de una membrana que está polarizada eléctricamente con

un potencial de alrededor de -0.1 voltio, siendo negativa la superficie interna respecto de la externa. Esta membrana, llamada *sarcolema*, se despolariza fisiológicamente cada vez que un impulso nervioso alcanza la placa motora del músculo (*placa mioneural*) y activa la membrana. El resultado final es la contracción de todas las fibras de manera coordinada.

En la fibra muscular existen tres componentes citoplásmicos altamente diferenciados. Uno está representado por la maquinaria contráctil de los miofilamentos, constituida de manera fundamental por proteínas y que se desarrolla embriológicamente dentro de la matriz citoplásmica.

Como se mencionará más adelante, la disposición de los miofilamentos proteicos determina los diferentes tipos de músculo existentes. Por ejemplo, en los músculos esqueléticos y en el miocardio de los vertebrados, los filamentos están orientados longitudinalmente y existe una organización trasversal que se repite de modo regular. En otros tipos de músculo no estriado, los filamentos se orientan en forma longitudinal u oblicua, o se distribuyen más o menos arbitrariamente.¹

El segundo componente del músculo estriado es una diferenciación especial del sistema vacuolar que constituye el *retículo sarcoplásmico*, relacionado con la conducción en el interior de la fibra y con la coordinación de la contracción de las diferentes miofibrillas. También intervendría en la relajación del músculo después de la contracción.

El tercer componente está integrado por las mitocondrias, que reciben el nombre de *sarcosomas*, y en ciertos casos alcanza dimensiones considerables. La abundancia de mitocondrias depende de la frecuencia con que el músculo se contrae. En el miocardio, que

posee una contracción sostenida, se las halla en gran cantidad.

MIOFIBRILLAS

Organización macromolecular

Las miofibrillas son largas estructuras subcelulares de cerca de $1\ \mu$ de diámetro. Con el microscopio óptico se perciben las estriaciones características de la fibra entera, y consiste en la repetición de una unidad fundamental, el *sarcómero*, limitado por una banda densa (*telofragma* o *línea Z*). La línea Z se localiza en el centro de una zona menos densa, conocida como *banda I*, que corresponde al disco relativamente isotrópico (fig. 23-2). La *banda A*, anisotrópica a la luz polarizada, tiene una densidad mayor que la banda I. En ciertas condiciones se distingue una zona menos densa en el centro de la banda A, que la divide en dos semidiscos oscuros (fig. 23-2). Esta zona constituye el *disco H* (disco de Hensen), en cuyo centro puede observarse la línea M.

En un músculo de mamífero en relajación, la banda A mide alrededor de $1.5\ \mu$ de largo y la banda I, $0.8\ \mu$. Las estriaciones de las miofibrillas resultan de una variación periódica en la densidad, es decir, en la concentración del material a lo largo del eje, y como se encuentran al mismo nivel en diferentes miofibrillas, confieren un aspecto estriado a la fibra entera.

Cuando se examinan las miofibrillas con el microscopio electrónico, aparecen nuevas y más finas estructuras. El sarcómero está integrado en su mayor parte por miofilamentos de 50 a 100 Å de diámetro,² que han sido estudiados en los vertebrados y también en los insectos. Existen esencialmente dos tipos: uno de 100 Å de grosor y de $1.5\ \mu$ de largo, y otro de 50 Å de espesor y $2\ \mu$ de longitud. Como se aprecia en el esquema de la figura 23-3, ambos tipos de filamentos se encuentran al mismo nivel y se superponen en una extensión que depende del grado de contracción del sarcómero. En el estado de relajación, la banda I contiene únicamente filamentos finos, la banda H sólo filamentos gruesos y la banda A filamentos finos y gruesos que se superponen. En un corte transversal de la banda A, se observa mejor la disposición regular de las dos clases de filamentos (figuras 23-3 y 23-4).

En el músculo de los vertebrados, cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos finos, y cada filamento fino se halla situado simétricamente entre tres gruesos (fig. 23-4).

Como consecuencia de esa disposición, el número de filamentos delgados duplica al de los gruesos. Esta organización hexagonal paracristalina difiere en el músculo de los insectos, donde cada filamento delgado equidista de dos gruesos, que poseen un centro de menor densidad. En los músculos de la pata de la cucaracha cada miofilamento grueso está rodeado de doce miofilamentos delgados.³

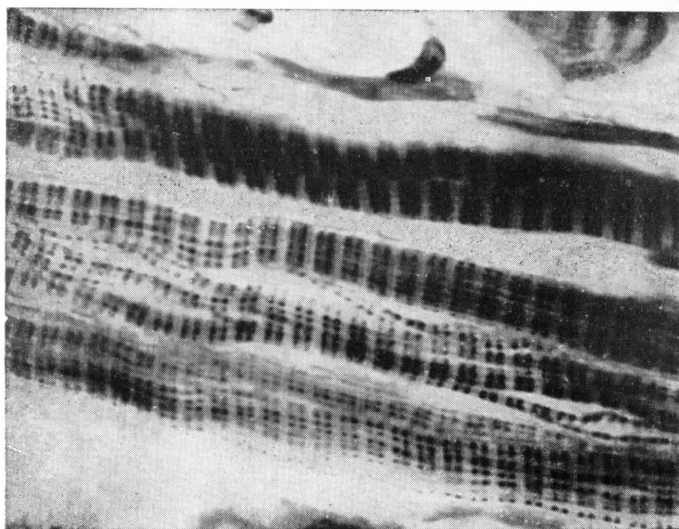


FIG. 23-1. Miofibrillas de una fibra muscular estriada. Coloración con hematoxilina férrica.

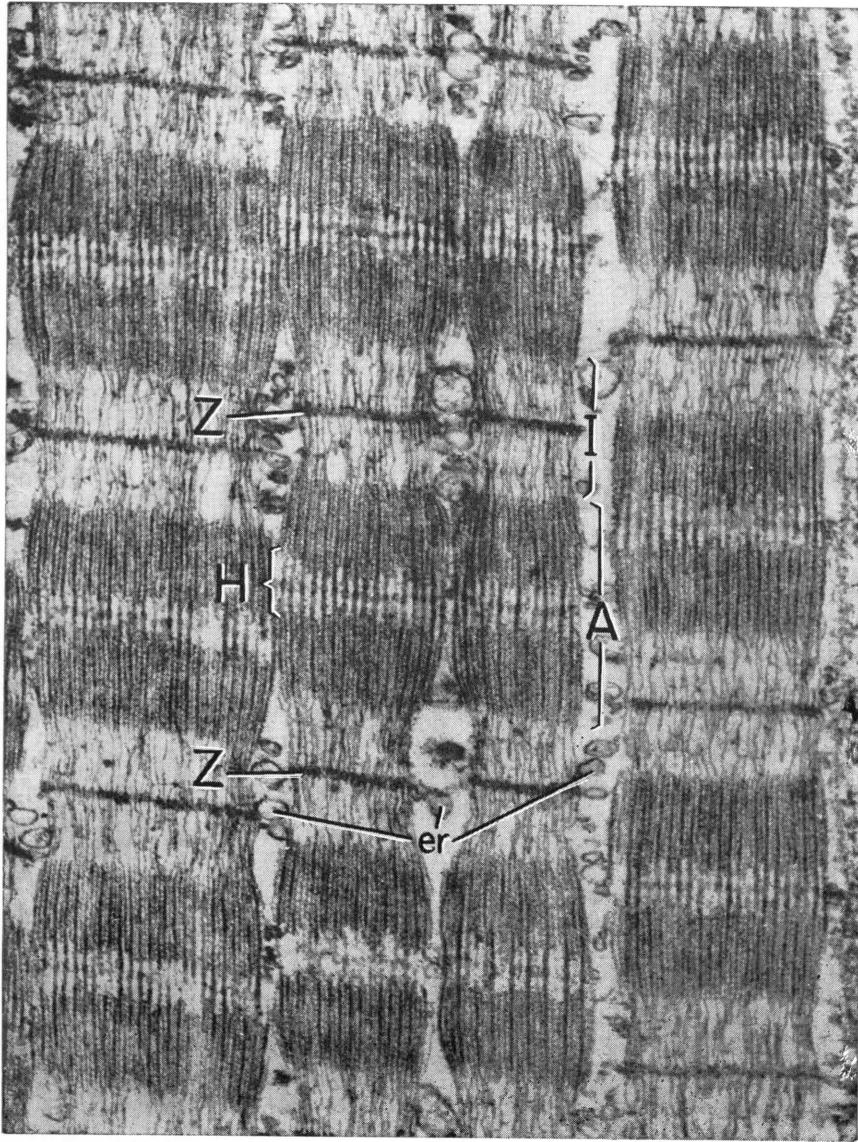


FIG. 23-2. Fotomicrografía electrónica de cuatro miofibrillas en la que se advierten varios sarcómeros con la línea Z y las bandas H, A e I. *er* Reticulo sarcoplásmico situado entre las miofibrillas. Se puede observar la estructura fina de la miofibrilla con los miofilamentos gruesos y finos. 60,000 $\times$. (Cortesía de H. Huxley.)

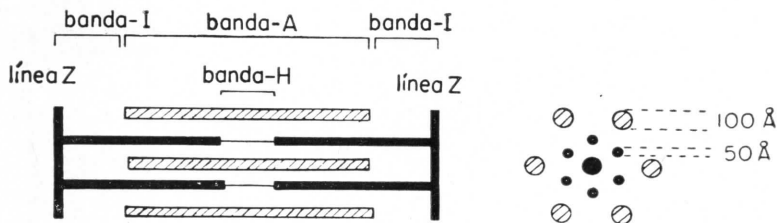


FIG. 23-3. Izquierda. Esquema de la disposición de los filamentos gruesos y finos dentro del sarcómero. Derecha. Corte transversal a través de la banda A; se observa la disposición hexagonal de los filamentos gruesos y delgados. (Según H. Huxley.)

Las figuras 23-2 y 23-5 ponen de manifiesto que los filamentos finos de un sarcómero atraviesan aparentemente la línea Z para pasar al sarcómero vecino, pero como se verá luego, esto puede no ser completamente exacto.

Otro detalle interesante revelado por el microscopio electrónico es que los dos conjuntos de filamentos están unidos entre sí por un sistema de puentes trasversales a los que se atribuye gran importancia en la contracción muscular⁴ (fig. 23-5). Los puentes surgen de los filamentos gruesos a intervalos de 60 a 70 Å. Cada puente está situado a lo largo del eje con una diferencia angular de 60°, lo cual significa que describen una hélice cada 400 Å. Mediante esta disposición un filamento grueso se une a los seis filamentos finos adyacentes cada 400 Å (fig. 23-6).

Cambios macromoleculares durante la contracción

Los cambios de las miofibrillas durante la contracción son de considerable interés y no dejan dudas de que ésta tiene lugar a nivel de los miofilamentos. Las técnicas modernas han confirmado la observación de la histología clásica que durante la contracción se verifica una inversión de las bandas. Las modificaciones del músculo se pueden investigar ahora en la fibra viviente con los microscopios de fase y de interferencia. Un hecho significativo es que la longitud de la banda A permanece constante dentro de una escala muy amplia de contracción, mientras que la banda I se acorta en relación con la contracción. La longitud de la banda H también varía con la contracción, aun cuando la distancia entre la parte final de la banda H de un

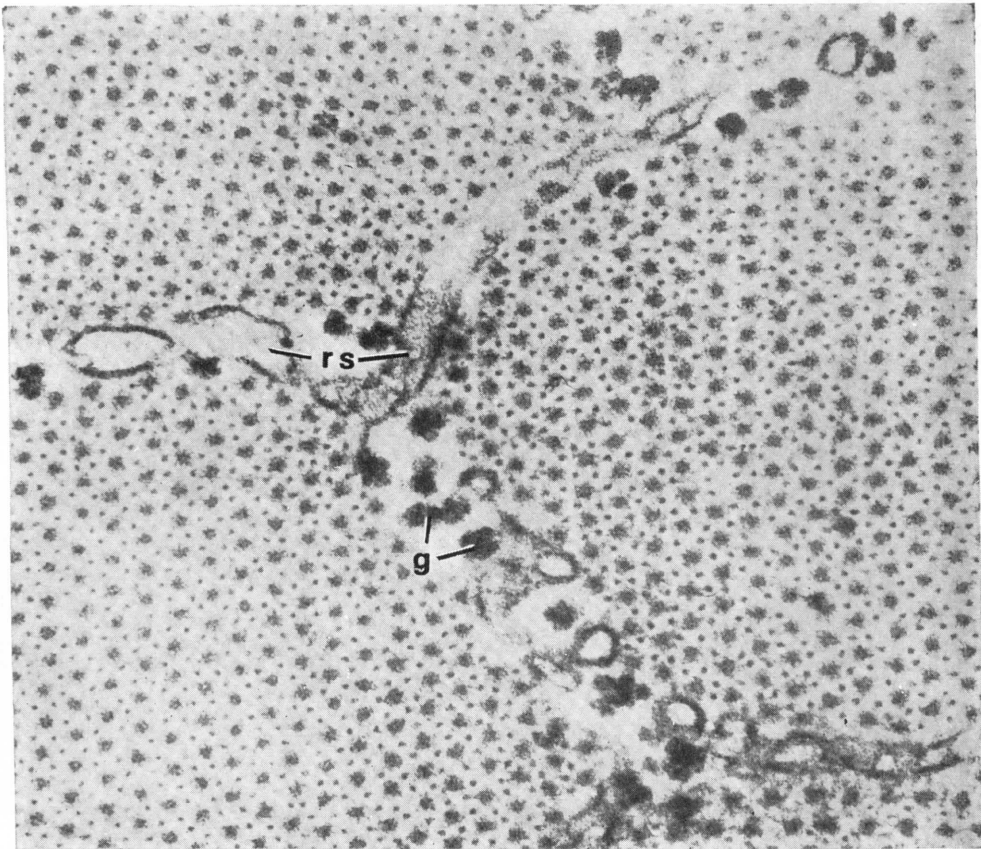


FIG. 23-4. Corte transversal de un músculo de conejo en el que se aprecia la disposición de los filamentos de miosina (gruesos) y de actina (finos). Obsérvese que hay un filamento fino por cada tres gruesos. Compárese con el esquema de la figura 23-3. *rs* Reticulo sarcoplásmico; *g*, glucógeno. 180,000 $\times$. (Cortesía de H. Huxley.)

sarcómero y el comienzo de la banda H del otro se mantiene invariable. Estos hallazgos han sido interpretados por la *teoría del deslizamiento* de los filamentos (véase más adelante). De acuerdo con ella, los dos tipos de filamentos conservan su longitud pero se deslizan unos respecto de los otros.

Cuando la contracción es suficientemente fuerte, los extremos de los filamentos finos se

aproximan cerrando la banda H; luego, también los gruesos entrarán en contacto a nivel de las líneas Z. En estas condiciones se puede observar la formación de nuevas bandas (inversión de la estriación), lo cual sugiere cierto grado de replegamiento y superposición de los filamentos.

El grado de contracción se determina midiendo la longitud del sarcómero en estado de reposo y des-

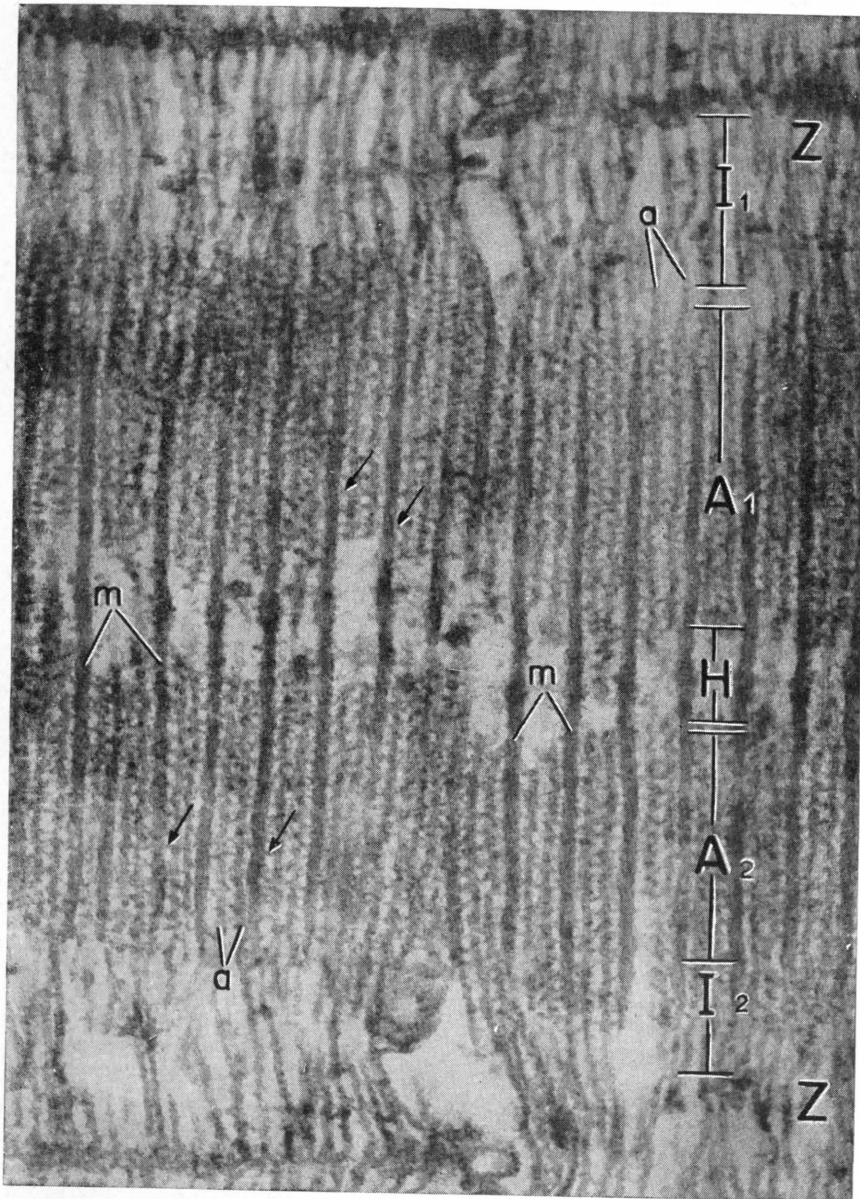


FIG. 23-5. Fotomicrografía electrónica de dos sarcómeros en miofibrillas adyacentes. Línea Z, I_1 e I_2 , semibandas isotrópicas; A_1 y A_2 , semibandas anisotrópicas; H, banda de Hensen; m y a, filamentos gruesos y finos. Se ven claramente los puentes entre los dos tipos de filamentos. Algunos de ellos se indican con flechas. 175,000 $\times$. (Cortesía de H. Huxley.)

pués de su acortamiento. Los músculos de los insectos por lo general se acortan poco (alrededor del 12 por ciento), mientras que en los vertebrados el acortamiento suele ser mucho mayor (aproximadamente 43 por ciento).

Otros tipos de organización macromolecular

El microscopio electrónico ha revelado que los músculos "lisos" de la microscopía óptica pueden presentar una variada organización macromolecular. En muchos casos, contienen miofilamentos delgados y gruesos, pero la diferencia reside en la ausencia de línea Z y en la falta de periodicidad. En los moluscos y anélidos se encuentran músculos con disposición helicoidal, en los que los miofilamentos gruesos y delgados están unidos por puentes transversales. En el músculo que cierra la concha de la ostra, que pertenece a la variedad de músculo con *paramiosina*, cada miofilamento grueso se halla rodeado de aproximadamente doce miofilamentos delgados.⁵

En el músculo liso de los vertebrados faltan aparentemente los dos tipos de miofilamentos que se reconocen en el estriado e, incluso, es difícil discernir las miofibrillas. Sin embargo, con los progresos experimentados en las técnicas de preparación se demostró la existencia de miofilamentos gruesos semejantes a los de miosina (Pease, 1968). Además, se consiguieron aislar las dos clases de miofilamentos en el músculo liso del pollo (Kelly y Rice, 1968). En este tipo de musculatura la contracción es lenta,

si bien puede alcanzar grados extremos de acortamiento.

Proteínas estructurales del músculo

Las semejanzas en la organización macromolecular se reflejan a nivel bioquímico por la presencia de proteínas estructurales específicas de la maquinaria contráctil del músculo. A mediados del siglo anterior Kuhne aisló una proteína muscular que denominó *miosina*; en 1942 Straub hizo lo propio con la *actina*, y en 1948 Bailey identificó a la *tropomiosina*. Estos tres grupos de proteínas se localizan en diferentes tipos de músculos.

En el tejido muscular entre el 60 y el 70 por ciento de las proteínas totales se hallan constituidas por proteínas estructurales. El resto (30 a 40 por ciento) se circunscribe fundamentalmente al sarcoplasma y comprende diversas proteínas solubles, enzimas y el transportador de oxígeno *mioglobina*. La *mioglobina* posee la cuarta parte del tamaño de la hemoglobina. Las tres proteínas estructurales o fibrosas constituyen casi el 90 por ciento de la miofibrilla, y se encuentran en el

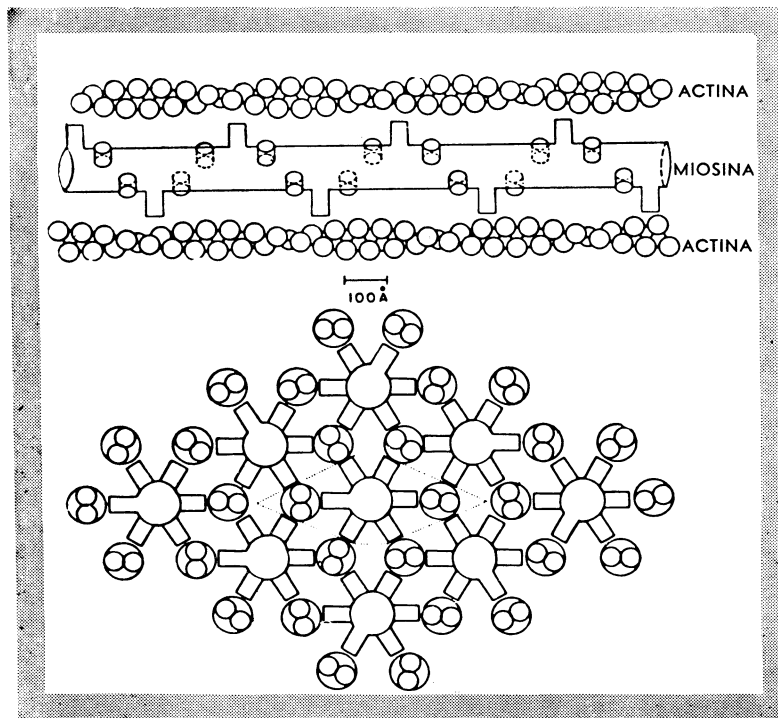


FIG. 23-6. Disposición espacial de los filamentos de actina y miosina en el músculo estriado. (De R. E. Davis.¹⁰)

músculo de los vertebrados en la siguiente proporción:^{6, 7}

Miosina	54 por ciento
Actina	20 a 25 por ciento
Tropomiosina	11 por ciento

Miosina. Si un músculo es tratado con una solución 0,3 M de ClK, la *miosina* se solubiliza primero y puede ser separada y purificada por precipitación a una concentración iónica más baja. La miosina comprende cerca de la mitad del total de la proteína muscular y tiene un peso molecular de 500,000.

Las moléculas individuales de miosina presentan forma de renacuajo y su longitud es de aproximadamente 1500 Å (tabla 8-1). La cabeza mide alrededor de 150 a 250 Å de largo y 40 Å de ancho; la cola tiene 15 a 20 Å de espesor y constituye el resto de la molécula.⁹ Se sabe actualmente que los miofilamentos gruesos están constituidos por miosina. Al ser aislados aparecen como elementos fusiformes de 110 Å de grosor con las típicas proyecciones laterales (o puentes) antes descritos (fig. 23-7).

Esos puentes corresponden fundamentalmente a las "cabezas" de la molécula de miosina, mientras que la mayor parte de la "cola" está en el eje del filamento. La miosina, que presumiblemente forma una sal con magnesio, se une con iones Na^+ y K^+ , lo mismo que con iones bivalentes.^{11, 12} Prácticamente todo el ATP del músculo se encuentra unido a la miosina.³⁷ Mediante una breve digestión con pepsina se ha fragmentado esta proteína en dos fracciones denominadas *meromiosinas*, de las cuales una es *pesada* y la otra *liviana*. Juntas determinan la unidad miosina.¹¹ Los puentes transversales observados en la miosina se asocian con la meromiosina pesada, mientras que el componente liviano se halla en el eje de los filamentos gruesos.⁸

Recientemente se ha descrito la miosina como una molécula polarizada, compuesta por dos mitades similares (fig. 23-8). Por acción de la tripsina se pueden separar dos moléculas de *meromiosina liviana* (peso molecular: 150,000) y dos de *meromiosina pesada*. Con papaina cada una de estas últimas es susceptible de dividirse en una unidad globular (peso molecular: 120,000) y en un cilindro helicoidal de 60.000 Daltons. La subunidad globular HMMS-1 (figura 23-8) es la porción más importante, puesto que contiene ATPasa y los sitios que fijan el ATP y la actina y constituyen las proyecciones laterales de la miosina (Lowey y col., 1969).

Actina. La otra proteína principal de tipo estructural, la *actina*, es menos soluble en las soluciones de ClK y se disuelve a una con-

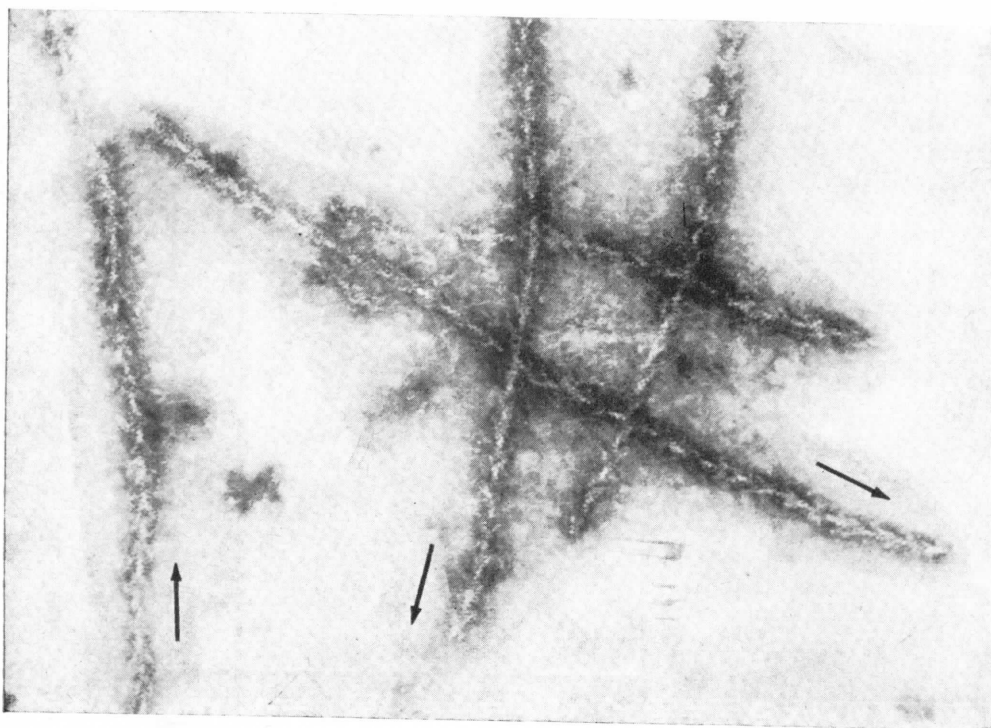


FIG. 23-7. Filamentos de actomiosina que resultan de la interacción entre actina y miosina (*meromiosina H*). Obsérvese la polaridad del complejo de actomiosina (flechas). Coloración negativa. 155,000 $\times$. (Cortesía de H. Huxley.)

centración de 0,6 M.⁶ En ausencia de sales, la actina se hace globular (*actina G*), con un peso molecular de alrededor de 70.000, pero en presencia de ClK y ATP se polimeriza formando largas fibras (*actina F*). Este cambio, que es reversible, se designa transformación globular-fibrilar.

Actina G. Se trata de una molécula esferoidal, con un diámetro de 53 Å, que carece de actividad ATPásica. Cada molécula contiene un ATP y un Ca⁺⁺. La polimerización en actina F se acompaña de desfosforilación del ATP ligado y liberación de fosfato. La *actina F* está constituida por dos cadenas helicoidales enroscadas entre sí.^{8, 13} Existen aproximadamente 13 actinas G por vuelta en cada cadena (fig. 23-6). El diámetro de esta doble hélice es de aproximadamente 70 a 80 Å. Como se mencionará más adelante, la actina F corresponde morfológicamente a los miofilamentos delgados.

Actomiosina. Cuando la miosina y la actina se mezclan en el tubo de ensayo forman el complejo denominado *actomiosina*, que se contrae en presencia de ATP.¹⁴ Este experimento *in vitro* indica que la interacción de la actina y la miosina es esencial para que se produzca la contracción. Con el microscopio electrónico fue posible comprobar que las moléculas de miosina se unen oblicuamente y están orientadas hacia las moléculas de actina F.⁸

El complejo actomiosina tiene aspecto de pluma con una periodicidad de 366 Å (figura 23-7). Una configuración similar presentan los complejos formados por meromiosina pesada y actina F.

Tropomiosina. En los vertebrados, la *tropomiosina* suele hallarse en menor proporción que las otras dos proteínas estructurales y, tanto en músculos estriados como lisos, representa del 5 al 10 por ciento de las proteínas totales. Se la extrae en soluciones de cloruro de potasio 1M o en soluciones ácidas débiles. Es una molécula de aproximadamente 400 Å de longitud y un peso molecular de 54.000. Al igual

que la meromiosina liviana, la tropomiosina está constituida por dos cadenas polipeptídicas paralelas enroscadas, en una configuración α -hélix (véase cap. 4). Con el microscopio electrónico se ha observado que la tropomiosina tiende a formar una estructura cristalina cuadrangular, que evidencia cierta similitud con el sistema de los filamentos de interconexión hallados en la línea Z.⁸

Paramiosina o tropomiosina A. Es una proteína relacionada que se encontró en anélidos y moluscos, donde puede constituir hasta el 30 por ciento del total de algunos músculos, como los aductores de la concha de los lamelibranchios, que son capaces de mantener una alta tensión por largos períodos de tiempo.

Localización y desarrollo de las proteínas musculares. Diferentes métodos han permitido la localización de las proteínas musculares. Para este propósito se utiliza frecuentemente el tratamiento de las fibras con glicerol, por medio del cual se extraen los componentes solubles con poca o ninguna remoción de las proteínas estructurales y buena preservación de la ultraestructura. Cuando la miosina es extraída del músculo selectivamente, las bandas A desaparecen y los filamentos gruesos se mantienen, al igual que las líneas Z.¹⁵ Si se extrae la actina, gran parte de la banda I y de los miofilamentos delgados desaparecen.

La miosina y la actina también han sido localizadas en las bandas A e I, respectivamente, mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes (fig. 7-20).^{16, 17} La localización de la tropomiosina es todavía discutida. Como mencionamos anteriormente, en algunas características (su estructura cristalina, por ejemplo) se asemeja a la línea Z; sin embargo, las pruebas inmunológicas para la tropomiosina son positivas en la banda I, indicando que no sólo puede estar confinada a la línea Z, sino también hallarse en los filamentos delgados.^{17, 18}

Hace poco se propuso un modelo para explicar la estructura de la línea Z, según el cual está formada por asas que provienen de los filamentos de actina y sarcómeros adyacentes, o por asas de tropomiosina que presentan una configuración entrecruzada.¹⁹ La localización de la tropomiosina es también objeto de estudio mediante métodos especiales que permiten extraer las líneas Z y M, y reconstituirlas en fibras musculares glicerinas.²⁰

Un recurso interesante para dilucidar el problema de la localización proteica es el estudio del desarrollo muscular. La observación de músculo esquelético embrionario en cultivo de tejidos, demuestra que los miofilamentos se continúan formando por varios días en presencia de actinomicina D, antibiótico que inhibe la síntesis de ARN. Se ha sugerido que ARN-s mensajeros de larga vida pueden estar implicados en

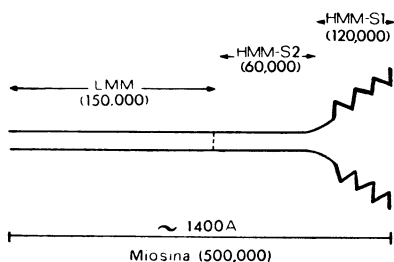


FIG. 23-8. Esquema de una molécula de miosina. (Véase la descripción en el texto.) (De Lowey y colaboradores, 1969.)

la síntesis de proteínas miofibrilares.²¹ En mioblastos de pollo se comprobó que tanto los filamentos gruesos como los delgados aparecen al mismo tiempo en la matriz citoplásmica, pero los filamentos delgados (actina) lo hacen en mayor número que los filamentos gruesos (miosina). Ello significa que al comienzo de la síntesis predomina la actina. Los miofilamentos se van orientando en el eje longitudinal antes de ser incorporados a las miofibrillas. Varias hipótesis se han enunciado para explicar el modo en que los miofilamentos se integran en la organización de las miofibrillas, así como la formación de la línea Z y de la estructura sarcomérica.²²

CONTRACCIÓN MUSCULAR

Teoría del deslizamiento de los filamentos

Lo explicado en párrafos precedentes acerca de la organización macromolecular de las miofibrillas ha dado lugar a la teoría del mecanismo por deslizamiento de la contracción muscular de acuerdo con la cual se produce un desplazamiento de los filamentos gruesos de miosina respecto de los filamentos finos de la actina durante cada ciclo de contracción y relajación.¹⁰ En el sarcómero del músculo de rana, que mide 2,5 μ , cada contracción va acompañada de un acortamiento de cerca del 30 por ciento, lo que implica un deslizamiento de 0,37 μ para cada hemisarcómero. Un deslizamiento de tal magnitud requiere la interacción reiterada de los puentes transversales con los filamentos de actina (figura 23-6). Se supone que el extremo del puente contiene un sitio enzimático para separar el fosfato terminal del ATP y otro sitio para combinarlo con la actina. Los puentes transversales pueden oscilar y unirse a puntos específicos de las moléculas de actina. Por cada puente de miosina se estima que el ATP proporciona un movimiento de 50 a 100 Å.

El descubrimiento actual de que los filamentos de actina y miosina están polarizados, se relaciona con la teoría del deslizamiento. Los filamentos de actina se hallan interrumpidos en la línea Z, pero es posible que a su nivel se comuniquen por medio de una estructura compleja de tropomiosina. Además, a partir de cada línea Z, los filamentos de actina están polarizados hacia las bandas H respectivas. Existen evidencias de que todos los monómeros de actina de un lado de la línea Z apuntan en una dirección, mientras que los del lado opuesto se polarizan en la dirección contraria. En miofilamentos gruesos aislados se descubrió una zona central de aproximadamente 1200 a 1500 Å de diámetro que carece de proyecciones, observándose que la po-

laridad de éstas se invierte en cada mitad de la banda A. La polarización molecular de ambas proteínas parece ser esencial para la contracción muscular en este mecanismo de deslizamiento.

En el sarcómero la bipolaridad de la actina se complementaría con la correspondiente del miofilamento miosínico.²³

La información detallada de los aspectos ultraestructurales y bioquímicos hasta el momento obtenida, permite interpretar los mecanismos macromoleculares inherentes a la contracción muscular. Puede afirmarse que se trata de un fenómeno cíclico, que implica la formación y ruptura, sucesivas y alternantes, de uniones actina-miosina entre ambos miofilamentos. En cada puente tendría lugar la siguiente secuencia: a) unión entre una cabeza de meromiosina pesada y una unidad de actina G globular; b) ruptura de la unión por una molécula de ATP; c) hidrólisis del ATP por la ATPasa miosínica activada por el Ca^{++} ; d) formación de un nuevo puente entre la misma meromiosina pesada y la unidad de actina G globular siguiente. El máximo movimiento relativo del miofilamento delgado que se produce en cada ciclo sería equivalente al tamaño de la actina G (53 Å).

Una observación interesante relacionada con el mecanismo de contracción es que la distancia entre filamentos delgados y gruesos varía según el grado de contracción. En efecto, disminuye cuando el músculo se estira y aumenta cuando éste se contrae. Se ha propuesto como posible mecanismo de deslizamiento la flexión de los puentes transversales. Durante la contracción se establecería una unión rígida entre la cabeza globular de la miosina y la actina, simultáneamente con la hidrólisis del ATP, y un cambio en el ángulo de dicha unión.

Como demuestra la figura 23-9, un movimiento relativamente pequeño de las dos subunidades globulares de la meromiosina pesada suscitara el deslizamiento del filamento de actina con respecto al de miosina (Huxley, 1969).

Energética de la contracción

Mientras las miofibrillas constituyen la maquinaria mecánica del músculo, el combustible necesario es producido principalmente en el sarcoplasma. En todos los tipos de músculos gran número de mitocondrias, denominadas *sarcosomas*, proporcionan los procesos

esenciales de la fosforilación oxidativa y del ciclo de Krebs (véase cap. 5). Estas mitocondrias son particularmente abundantes y de tamaño considerable en el músculo cardíaco y en los músculos de las alas de los pájaros e insectos.

La matriz sarcoplásmica contiene enzimas glucolíticas y también proteínas globulares como la mioglobina, sales y compuestos de fosfato de alto poder energético. El glucógeno se encuentra en la matriz como gránulos diminutos visibles con el microscopio electrónico. En el músculo existe alrededor de 1 por ciento de glucógeno y 0,5 por ciento de fosfocreatina como fuente de energía. El glucógeno desaparece con la contracción a través de la glucólisis, formándose de este modo el ácido láctico, que puede transformarse en ácido pirúvico y entrar en el ciclo de Krebs (véase cap. 5).

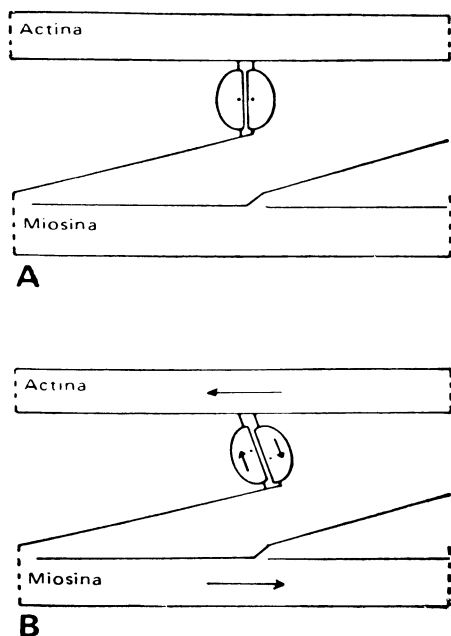


FIG. 23-9. Esquema que ilustra el posible mecanismo del desplazamiento de la miosina y la actina. La contracción de las subunidades globulares de la miosina es capaz de producir una acentuada flexión de la molécula de miosina. (Cortesía de H. E. Huxley.)

La energía inicial necesaria para la contracción proviene del ATP, y a ello sigue con cierto retardo una fase térmica subdividida en dos componentes: uno anaerobio y otro aerobio.²⁴

El ADP producido después de la contracción inicial se convierte nuevamente en ATP por medio de la glucólisis o a partir de la fosfocreatina. La fosforilación oxidativa constituye la última y más importante fuente de ATP.

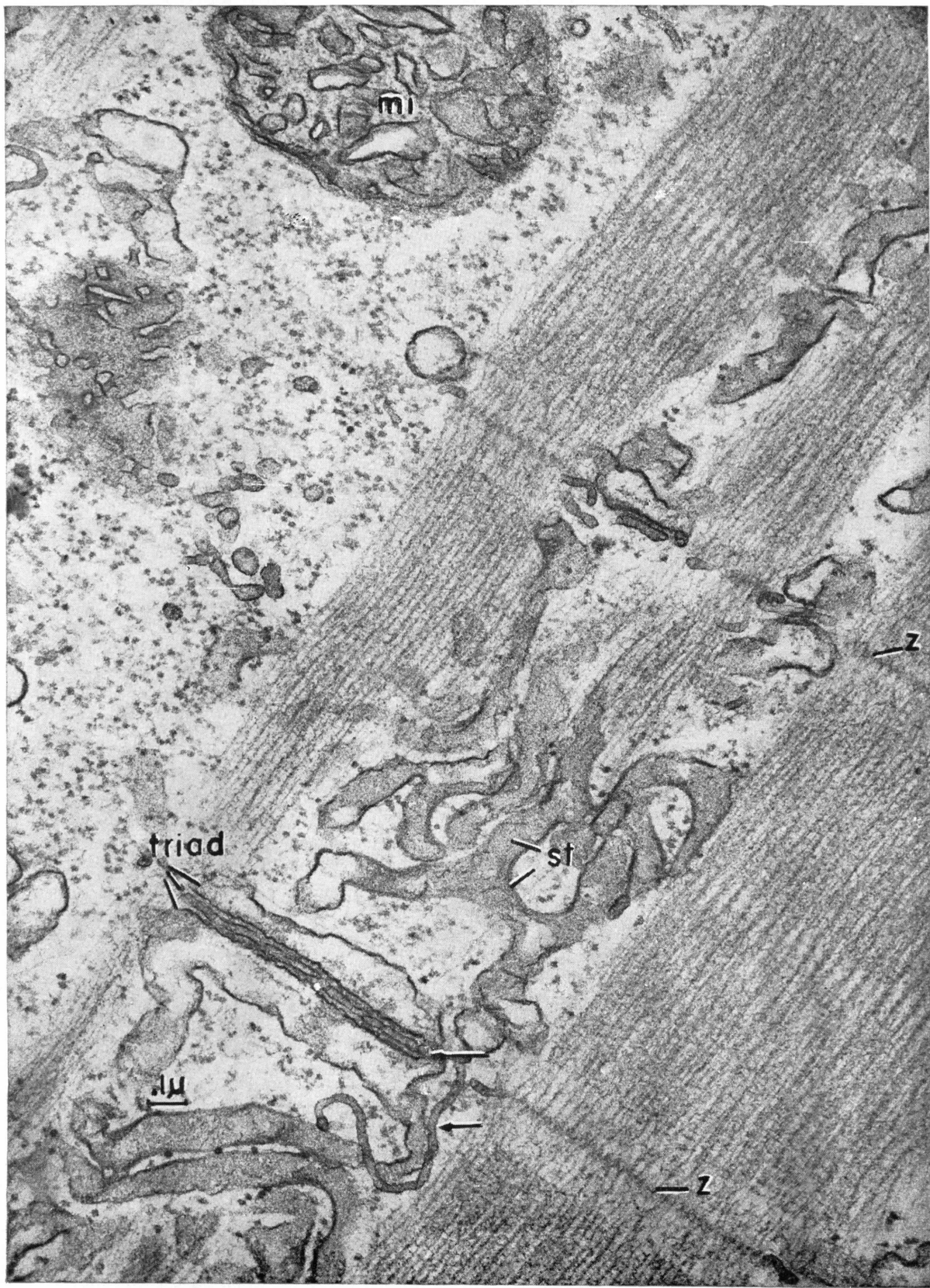
Ya hemos mencionado que otros tipos de células contráctiles pueden ser inducidas a contraerse por el ATP. Así sucede con los cilios, flagelos, colas de espermatozoides y células en división (véase cap. 22). También el músculo extraído con glicerol pierde el ATP y se convierte en un modelo que puede contraerse agregando jugo muscular fresco o ATP. Se presume que en todos estos casos existe un mecanismo molecular similar al de la contracción.

Retículo sarcoplásmico

El retículo sarcoplásmico de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas representa una de las especializaciones más interesantes del sistema vacuolar. Descubierto por Veratti en 1902 como un retículo presente en el sarcoplasma de la fibra muscular y que se extiende entre las miofibrillas, fue negado completamente hasta 1953, cuando se publicaron las primeras fotomicrografías electrónicas de esta estructura.^{25, 27}

El retículo sarcoplásmico puede considerarse como una diferenciación especial del sistema vacuolar en este tipo celular. Es un sistema reticular continuo, limitado por membranas, cuya organización se superpone a la de las miofibrillas. Como se ve en la figura 23-10, la organización de las vesículas y túbulos del retículo sarcoplásmico tiene una disposición muy regular. A nivel de la banda I se encuentran *cisternas terminales*, entre las cuales existe una vesícula central aplanada, formando en conjunto la *triada*.²⁸ En la su-

FIG. 23-10. Fotomicrografía electrónica del músculo estriado que evidencia dos miofibrillas, una de las cuales está cortada tangencialmente y muestra mejor la disposición del retículo sarcoplásmico. Se ven claramente los dos componentes de este sistema. El componente transversal está representado por una triada y especialmente por la cisterna central que se continúa en túbulos especiales (*flechas*). Véase la relación de la triada con la línea Z. El componente longitudinal del retículo sarcoplásmico (*sf*) forma túbulos que se anastomosan en la superficie del sarcómero. *mi* Mitocondria. (Cortesía de K. R. Porter.)



perficie de la banda A del sarcómero, los túbulos que discurren entre las cisternas terminales se disponen longitudinalmente.

Esta estructura se repite en todas las miofibrillas y se continúa a través de la fibra muscular, haciendo conexión con la membrana superficial a nivel de las líneas Z. Las primeras observaciones realizadas con el microscopio óptico indicaban que las líneas Z o *te-lofragmas* eran tabiques continuos que atravesaban la fibra alcanzando el sarcolema, pero el microscopio electrónico reveló claramente que la continuidad se establece sólo por medio del retículo sarcoplásmico. Investigaciones más recientes han insistido en que el retículo sarcoplásmico puede dividirse en dos partes. Una de ellas se orienta longitudinalmente a lo largo de las miofibrillas y sería el equivalente del retículo endoplásmico de las células. La otra es un componente transversal contenido entre las cisternas terminales, con las cuales forma la tríada. El componente transversal (sistema T)²⁹ aparentemente se continúa en ciertos puntos con la membrana plasmática del sarcolema y podría ser la estructura más adecuada para conducir los impulsos desde la superficie de la fibra a las regiones más profundas de ella.

El empleo de moléculas de ferritina permitió demostrar las conexiones existentes entre el sistema T y la membrana plasmática. En músculos de rana sumergidos por cortos periodos en una solución de ferritina, se constató que la vesícula central de la tríada se llenaba de moléculas densas a los electrones. La ferritina puede también hallarse en túbulos que continúan al elemento T de la tríada. Estos hallazgos sugieren que a nivel de la membrana plasmática existe un número pequeño de orificios que comunican directamente con el sistema transversal del retículo sarcoplásmico a través de finos túbulos. Es interesante recalcar que los componentes laterales de la tríada no presentan moléculas de ferritina en su interior,³⁰ de manera que no se conectarían con la membrana plasmática. La disposición del retículo sarcoplásmico varía en algunos invertebrados. En el músculo del cangrejo de río las invaginaciones de la membrana plasmática penetran a nivel de la unión A-I y se ramifican en túbulos que forman diadas, en lugar de tríadas, con el retículo sarcoplásmico.³¹

En los músculos de la cucaracha el retículo es abundante y configura una envoltura fenestrada alrededor de cada miofibrilla. Se observa un sistema T simple que constituye diadas con el retículo sarcoplásmico en sarcómeras alternantes.³²

Papel del retículo sarcoplásmico

La probable función del retículo sarcoplásmico en la fisiología de la fibra muscular se ha deducido de un experimento en el cual la

estimulación del sarcolema con microelectrodos a nivel de la banda Z suscita la contracción localizada del sarcómero adyacente. La excitación se transmite después al interior de la fibra.³³

Se ha formulado la hipótesis de que el retículo sarcoplásmico transmite la excitación intracelularmente.^{27, 34} Asimismo, se considera que la membrana del retículo, que separa dos compartimientos celulares diferentes, está polarizada eléctricamente lo mismo que la membrana externa de la fibra muscular. Por tanto, sería capaz de conducir los impulsos hacia el interior de la fibra y de activar los componentes contráctiles.

Recientemente se ha propuesto un modelo de corriente canalizada en el cangrejo de río, en el que se atribuye un papel directo al Cl^- y una posible interacción entre el Ca^{++} y el Cl^- (en lugar de una difusión electrotónica).³⁵ Cualquiera sea el mecanismo íntimo, es evidente que la presencia de este sistema conductor intracelular explica la paradoja fisiológica de que una fibra que tiene 50 a 100 μ de diámetro pueda contraerse rápidamente en todo su espesor, una vez que el potencial de acción pasa por la superficie.

Relajación muscular

Otro método interesante para estudiar el retículo sarcoplásmico es su aislamiento e identificación con el microscopio electrónico.³⁴ Se ha determinado que esta fracción contiene el factor susceptible de producir el relajamiento después de la contracción.

La relajación de las fibras musculares se induce disminuyendo la concentración de Ca^{++} en el líquido intracelular. El retículo sarcoplásmico puede incorporar activamente Ca^{++} en presencia de ATP, actuando a manera de bomba.³⁶ Este sistema de membranas contiene ATPasa activada por Ca^{++} , que está acoplada a la incorporación de Ca^{++} . Cuando las vesículas del retículo sarcoplásmico aislado son destruidas con desoxicolato, se suprime tanto la fijación de Ca^{++} radiactivo como el efecto de relajación. La incorporación de Ca^{++} puede inhibirse por estimulación eléctrica y por ciertas drogas que actúan como bloqueadores β -adrenérgicos.³⁷ La bomba de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico, así como otros sistemas de transporte activo, implican una asimetría funcional de la membrana. Puesto que tanto la ATPasa como la incorporación de Ca^{++} son inhibidos por agentes bloqueadores de los grupos $-\text{SH}$, es posible llevar a cabo estudios citoquímicos a nivel del microscopio electrónico usando un reactivo que une ferritina a las moléculas del agente bloqueador de los grupos $-\text{SH}$. Se demostró así que los grupos activos de la ATPasa ligada a la membrana estaban localizados en la superficie externa del retículo sarcoplásmico aislado.³⁸ Todos estos hallazgos indican que el retículo sarcoplásmico tiene a su cargo el importante papel de relajar la fibra después de la contracción y que ello se produce por la fijación de Ca^{++} a la superficie externa y su transporte hacia el interior de las vesículas.

La secuencia de acontecimientos producidos después de la llegada de la señal eléctrica que viaja a lo largo de la membrana plasmática de la fibra muscular, puede ser la siguiente: la señal es "recibida" a nivel de una banda Z determinada o en una unión A-I, por medio de las vesículas intermediarias (sistema T). Esto pone en acción una serie de fenómenos que comprenden la liberación de Ca^{++} en la vecindad de la tríada, la activación de la miofibrilla por el ATP y la incorporación del Ca^{++} por los elementos del retículo, que inhibe la ATPasa de las miofibrillas e induce la relajación.²⁶

Todos los datos mencionados y los que conciernen al mecanismo de deslizamiento de la contracción pueden integrarse en una teoría de la contracción muscular.²⁴ Este es uno de los mejores ejemplos hasta ahora estudiados de la relación estrecha entre los procesos energéticos y el mecanismo que interviene en la contracción. La estructura y la función están tan íntimamente relacionadas dentro de la organización molecular del músculo, que forman una unidad indivisible.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bourne, C. (ed.): (1960) *Structure and function of muscles*. 2 volumes. Academic Press, New York.
- Ebashi, S. E. and Endo, M.: (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. molec. Biol.*, 18:123.
- Huxley, H. E.: (1960) Muscle cells. In: *The cell*, vol. 4, p. 365. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Huxley, H. E.: (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164:1356.
- Kelly, R. E. and Rice, R. V.: (1968) Localization of myosin filaments in smooth muscle. *J. Cell Biol.*, 37:105.
- Lowey, H., Slayter, S., Weeds, A. G. and Baker, H.: (1969) Substructure of the myosin molecule. *J. molec. Biol.*, 42:1.
- Peachey, L. D. and Porter, K. R.: (1959) Intracellular impulse conduction in muscle cells. *Science*, 129:721.
- Pease, D. C.: (1968) Structural features of unfixed mammalian smooth and striated muscle prepared by glycol dehydration. *J. Ultrastruct. Res.*, 23:280.
- Pepe, F. A.: (1968) Analysis of antibody staining patterns obtained with striated myofibrils in fluorescence microscopy and electron microscopy. *Int. Rev. Cytol.*, 24:193.
- Szent-Györgyi, A.: (1947) *Chemistry of muscular contraction*. Academic Press, New York.
3. Hagopian, M.: (1966) *J. Cell Biol.*, 28:545.
4. Huxley, H. E.: (1958) *Scient. Amer.*, 199 (Nov.) 67.
5. Hanson, J. and Lowy, J.: (1961) *Proc. roy. Soc. B.*, 154:173.
6. Straub, F. B.: (1942) *Stud. Inst. M. Chem. Univ. Szeged.*, 2:3.
7. Mommaerts, W.: (1950) *Muscular contraction*. Interscience Publishers, New York.
8. Huxley, H. E.: (1963) *J. molec. Biol.*, 7:281.
9. Zobel, C. R. and Carlson, F. D.: (1963) *J. molec. Biol.*, 7:739.
10. Davies, R. E.: (1963) *Nature*, 199:1068.
11. Szent-Györgyi, A.: (1953) *Chemical Physiology of contraction in body and leart muscle*. Academic Press, New York.
12. Szent-Györgyi, A.: (1955) *Adv. Enzymol.*, 16:313.
13. Hanson, J. and Lowy, J.: (1963) *J. molec. Biol.*, 6:46.
14. Szent-Györgyi, A.: (1957) *Chemistry of molecular contraction*. Academic Press, New York.
15. Hanson, J. and Huxley, H. E.: (1957) *Biochim. biophys. Acta*, 23:250, 260.
16. Marshall, J. M., Jr., Holtzer, H., Finck, H. and Pepe, F.: (1959) *Exp. Cell Res.*, suppl., 7:219.
17. Pepe, F. A.: (1966) *J. Cell Biol.*, 28:505.
18. Ebashi, S. and Kodama, A.: (1966) *J. Biochem.*, 60:733.
19. Kelly, D. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:827.
20. Stromer, M. H., Hartshorne, D. J. and Ric, R. V.: (1967) *J. Cell Biol.*, 35:23.
21. Yaffec, D. and Feldman, M.: (1964) *Develop. Biol.*, 9:347.
22. Fischman, D. A.: (1966) *J. Cell Biol.*, 32:557.
23. Reedy, M. K.: (1968) *J. molec. Biol.*, 31:155.
24. Ruch, T. C. and Fulton, J. F.: (1960) *Medical Physiology and Biophysics*. Chap. 4. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
25. Bennett, H. S. and Porter, K. R.: (1953) *Amer. J. Anat.*, 93:1.
26. Porter, K. R.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10 suppl., 219.
27. Porter, K. R.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2 suppl., 163.
28. Huxley, A. F. and Taylor, R. E.: (1955) *J. Physiol.*, 130:46.
29. Andersson-Cedergren, E.: (1959) *J. Ultrastruct. Res.*, suppl. 1.
30. Huxley, H. E.: (1964) *Nature*, 202:1067.
31. Brandt, P. W., Reuben, J. P., Girardier, L. and Grunfest, H.: (1965) *J. Cell Biol.*, 25:233.
32. Hagopian, M. and Spiro, D.: (1967) *J. Cell Biol.*, 32:535.
33. Peachey, L. D. and Porter, K. R.: (1959) *Science*, 129:721.
34. Muscatello, V., Andersson-Cedergren, E., Azzone, G. F. and von Der Decken, A.: (1961) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 10 suppl., 201.
35. Reuben, J. P., Brandt, P. W., Garcia, H. and Grundfest, H.: (1967) *Amer. Zool.*, 7:623.
36. Ebashi, S. and Lipman, F.: (1962) *J. Cell Biol.*, 14:389.
37. Scales, B. and McIntosh, D. A. D.: (1968) *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 160:249, 261.
38. Hasselbach, W. and Elfvin, L. G.: (1967) *J. Ultrastruct. Res.*, 17:598.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Huxley, H. E.: (1966) *Harvey Lec.*, Sec. 60:85
2. Hall, C. E., Jakus, M. A. and Schmitt, F. O.: (1946) *Biol. Bull.*, 90:32.

Bases celulares de la conducción nerviosa y de la transmisión sináptica

Una de las funciones más importantes de los organismos vivos consiste en *reaccionar* a modificaciones del medio o *estímulo*. En su sentido más amplio, esta propiedad general de las células y organismos multicelulares se denomina *irritabilidad*. Por ejemplo, un protozoo (organismo unicelular) puede reaccionar a diferentes estímulos, como los cambios de temperatura y luminosidad o la presencia de una partícula alimenticia, con una respuesta mecánica expresada por el movimiento ciliar, el ameboides, etc. (véase cap. 22).

También los vegetales reaccionan a los cambios del ambiente por medio de respuestas lentas que producen un crecimiento diferencial llamado *tropismo*. Así, las respuestas a la fuerza de gravedad, temperatura, luz, tacto y compuestos químicos, se designan *geotropismo*, *termotropismo*, *fototropismo*, *tigmotropismo* y *quimiotropismo*, respectivamente. La irritabilidad alcanza su máximo desarrollo en los animales donde células particulares del tejido nervioso están diferenciadas para responder rápida y eficazmente a los diferentes estímulos originados en el medio interno y en el externo.

En estos organismos se han diferenciado *receptores* especiales, adaptados para "recibir" distintos tipos de estímulos. Los receptores se hallan constituidos por células o por las terminaciones distales de las neuronas, especializadas en la recepción del estímulo. Por ejemplo, los receptores a la luz, tacto, presión, calor, frío, etc., se caracterizan por su gran sensibilidad al estímulo específico. Aun un estímulo muy pequeño puede suscitar una respuesta. Ello significa que *el umbral de excitación* es mucho más bajo en el receptor que en cualquier otra parte de la célula nerviosa.

La respuesta al estímulo es de naturaleza variable en los animales. Lo más frecuente es que reaccionen con un rápido movimiento debido a la contracción muscular (véase cap. 23). Sin embargo, pueden ocurrir otros tipos de reacción: un perro hambriento, en presencia de alimentos, reacciona segregando saliva; un pez eléctrico, al ser tocado, produce una descarga eléctrica y una luciérnaga, emite luz.

Estos diferentes tipos de respuestas se manifiestan en tejidos especializados (músculos, glándulas, placas eléctricas, órganos luminosos), los *efectores*, que se encuentran bajo el control de neuronas eferentes.

El arco reflejo. Potencial de acción

En un animal el mecanismo más simple de acción nerviosa está representado por el arco reflejo monosináptico, que consiste en un circuito neuronal formado por dos células nerviosas o *neuronas*. Una de ellas es *sensorial* (*aférente*) y posee un receptor en una terminación para recibir el estímulo.

Por el extremo opuesto realiza un contacto especial (*sinapsis*) con una neurona *eferente* (*motora*), la cual a su vez actúa sobre el efector (por ejemplo, el músculo).

La figura 24-1 ilustra esquemáticamente el modo por el cual la información *recibida* a nivel del receptor es *conducida* a lo largo de la neurona sensorial y después *transmitida* por la sinapsis. Se observa que una nueva onda de información parte de la segunda neurona y llega finalmente al efector, donde es elaborada la respuesta final.

Como veremos más adelante, en los nervios y en el músculo la información se propaga por la superficie de la membrana mediante variaciones transitorias del *potencial estable*

o *de reposo* (véase cap. 21). Este cambio origina una *onda de excitación* que se desplaza a lo largo de la superficie, de un extremo a otro de la célula. En la célula nerviosa, al *potencial propagado* o de acción también se lo conoce como *impulso nervioso*.

Los impulsos nerviosos son conducidos a través de las porciones alargadas de las neuronas (fibras nerviosas), por medio de los potenciales de acción. A la altura de los receptores, sinapsis y efectores generan otros potenciales eléctricos con diferentes características.

Este capítulo estará dedicado fundamentalmente a las *bases celulares de la conducción nerviosa y de la transmisión sináptica*.

Organización general de la neurona

La célula nerviosa o neurona es la célula más diferenciada de todo el organismo. Después de la vida embrionaria las neuronas no se dividen y persisten en una interfase continua durante el período de crecimiento posnatal y a lo largo de la vida entera del individuo (véase cap. 20). En este lapso, las neuronas pueden experimentar cambios en el volumen y en la cantidad y complejidad de sus prolongaciones y contactos funcionales, pero su número no aumenta por divisiones celulares.

Ello es de gran importancia porque las células nerviosas, además de conducir y transmitir impulsos, almacenan *información* instintiva y adquirida (reflejos condicionados, memoria), función que puede ser realizada con mayor eficacia por un sistema de estructuras más permanentes.

El estudio de diferentes tipos de neuronas e interconexiones neuronales compete a los tratados de Histología y Neuroanatomía, por lo que sólo se expondrán aquí algunas consideraciones generales.

En las neuronas la adaptación a las funciones especializadas se efectúa por medio de diferentes tipos de prolongaciones. Como demuestra la figura 24-1, el cuerpo celular o pericarion emite una o más prolongaciones cortas, las *dendritas*, que transportan los impulsos nerviosos centripetamente, y una más larga, o *axón*, que conduce los impulsos en sentido centrifugo a la neurona siguiente o al efector. El axón se denomina fibra nerviosa cuando, después de salir de la neurona, es envuelto por las diferentes vainas. El axón concluye ramificándose en el *telodendron* o *terminación nerviosa*. Existen neuronas que poseen sólo una dendrita y el axón (*bipolares*) y otras que tienen únicamente el axón (*monopolares*); las restantes, provistas de muchas prolongaciones (*multipolares*), son

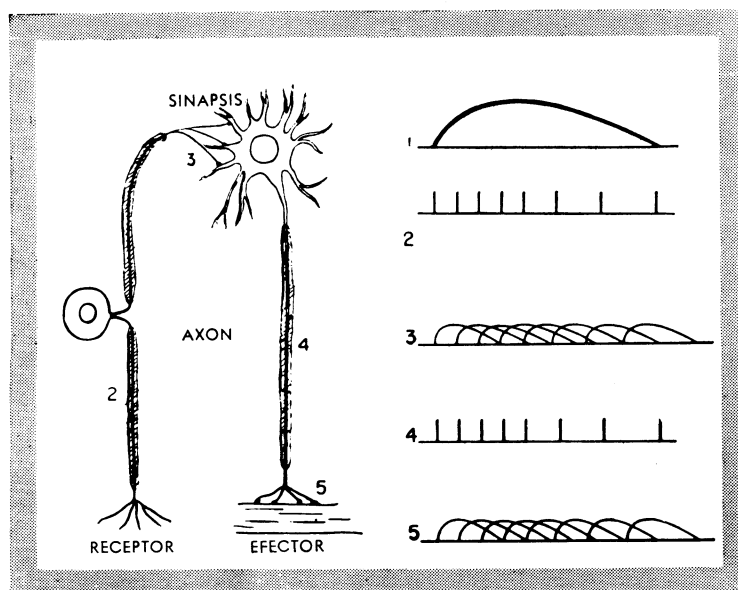


FIG. 24-1. *Esquema de un arco reflejo monosináptico. Izquierda.* Una neurona sensorial y otra motora con la unión sináptica. Véase el receptor y el efector. *Derecha.* Diferentes tipos de potenciales producidos en las distintas porciones del arco reflejo (1-5) indicadas en la figura. (De Bishop, modificado.)

las más comunes. En los invertebrados prevalecen las neuronas monopolares.

Como veremos más adelante, las fibras nerviosas son componentes de la neurona adaptados a la conducción rápida de impulsos sin pérdidas a través de largas distancias.

Función biosintética del pericarion. El pericarion nervioso se caracteriza por la presencia de cantidades considerables de material basófilo —la sustancia de Nissl— que, como en otras células, está constituida por ribosomas y retículo endoplásmico. Es también característico de la neurona el poseer un complejo de Golgi bien desarrollado. Las neuronas inmaduras, o *neuroblastos*, contienen un número considerable de ribosomas libres. En estadios más tardíos aparece el sistema vacuolar. La gran abundancia de ribosomas se encuentra en relación con las propiedades biosintéticas del pericarion, del cual depende un volumen de citoplasma en las prolongaciones que puede ser muy superior al del cuerpo celular. En efecto, en ciertos mamíferos existen axones de hasta un metro o más de largo.

El mantenimiento del territorio comple-

to de la neurona con todas sus expansiones está subordinado a procesos de síntesis controlados por el núcleo (fig. 24-2). Si una fibra nerviosa es cortada, el segmento distal degenera (degeneración walleriana), pero en una etapa ulterior el muñón proximal puede regenerarse mediante un proceso de crecimiento regido por el pericarion. Existen también evidencias experimentales en el sentido de que el axón crece y simultáneamente es usado en las terminaciones.¹

El esquema de la figura 24-2, que proviene principalmente de estudios radioautográficos, con el microscopio electrónico indica los principales sitios de síntesis proteica (S) en el pericarion y el modo por el cual las proteínas son transferidas a las prolongaciones neuronales. Aunque los aminoácidos marcados pueden ser incorporados tempranamente en el nucléolo y en la cromatina, así como también en las mitocondrias, es evidente que los sitios activos de síntesis proteica son los ribosomas, desde donde las proteínas pasan luego al núcleo, mitocondrias, y otros orgánoides celulares. Una de las fracciones más importan-

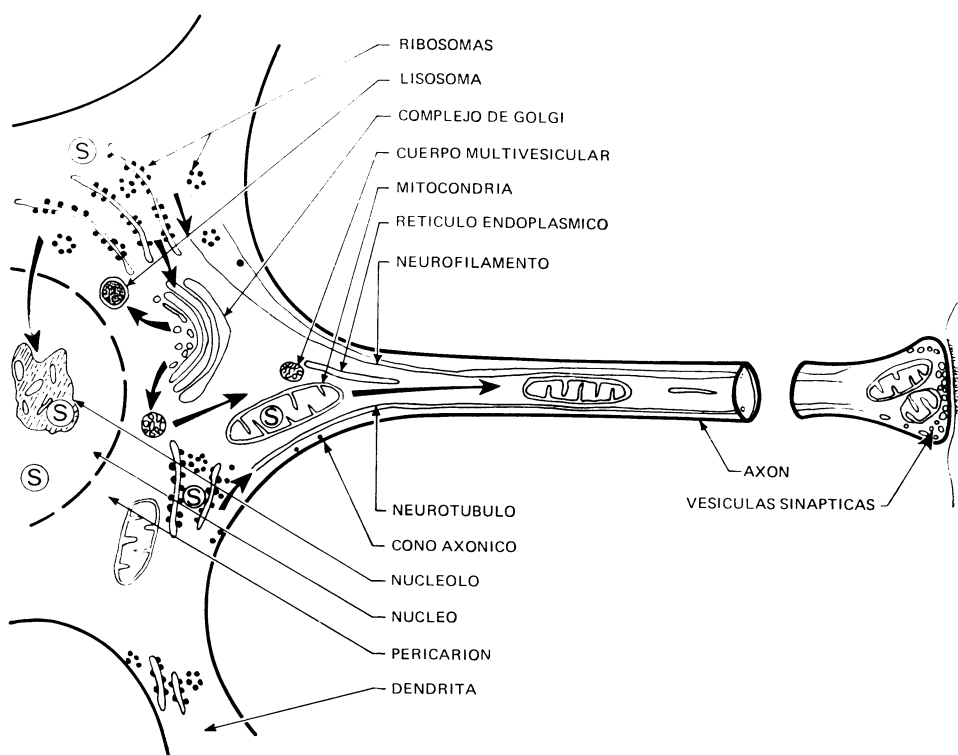


FIG. 24-2. Esquema de la ultraestructura de la neurona y del proceso de la biogénesis y transporte de las proteínas. (Cortesía de B. Droz.)

tes tiene a su cargo aparentemente la formación de las subunidades que componen los neurofilamentos y neurofibrillas presentes en los axones y dendritas (véase más adelante).^{2, 3} Otra fracción, que se localiza en el complejo de Golgi, es susceptible de asociarse con lisosomas, cuerpos multivesiculares, vesículas neurosecretoras, gránulos u otros elementos vesiculares. En la región de Golgi, azúcares del tipo de la glucosamina, galactosa y otros pueden ser incorporados a la molécula proteica, formando glucoproteínas. Existen pruebas de que muchos de estos organoides, proteínas estructurales y enzimas sintetizadas en el axón se desplazan a diferentes velocidades hacia las terminaciones nerviosas por el mecanismo de *flujo axónico*.⁴

Sin embargo, no debe descartarse totalmente la posibilidad de que exista algún tipo de síntesis proteica en el axón y en las terminaciones nerviosas (para mayores detalles sobre la estructura neuronal, véase²).

Fibras nerviosas: diámetro y velocidad de conducción

Las fibras nerviosas son *amielínicas*, cuando están envueltas sólo por las células de Schwann, y *mielínicas*, si además se agrega una vaina de mielina, compuesta por un sistema multilaminado lipoproteico (fig. 9-5). En el sistema autónomo de los vertebrados, la mayoría de las fibras nerviosas son amielínicas y se encuentran contenidas en las invaginaciones de la membrana plasmática de las células de Schwann. La vaina de mielina se interrumpe a la altura de los *nodos* o *estrangulaciones* de Ranvier. La distancia comprendida entre los nodos (internodo) varía con el diámetro de la fibra. El internodo es el segmento de mielina producido por una sola célula de Schwann y en ella contenido. En la rana el internodo mide 0,2 mm en una fibra de 4 μ de diámetro, 1,5 mm en una fibra de 12 μ y 2,5 mm en una de 15 μ .³ Posteriormente veremos la importancia de este hecho en la conducción saltatoria de las fibras mielínicas.

Dentro del internodo existen *incisuras* oblicuas (cónicas) que atraviesan la vaina de mielina y a cuyo nivel las laminillas de mielina son menos compactas. En el nodo, la lámina de mielina adopta una disposición muy laxa, por lo que una pequeña zona del axón se pone en contacto directo con el líquido extracelular. La vaina de mielina actúa como ais-

lante y, en consecuencia, las fibras mielínicas conducen los impulsos nerviosos a velocidades más rápidas que las amielínicas. El diámetro de la fibra también influye sobre la velocidad de conducción. Como se observa en la tabla 24-1, las fibras nerviosas pueden ser clasificadas en tres grupos: A, B, y C, de acuerdo con el diámetro. Las últimas son amielínicas. El diámetro varía entre 20 μ en la fibra A y menos de 1 μ en la fibra C, mientras que la velocidad de conducción oscila entre 100 y 2 metros o menos por segundo. En los mamíferos la velocidad de conducción del impulso nervioso sigue una relación lineal con el diámetro de las fibras mielínicas (fig. 24-3).

TABLA 24-1. Propiedades de las fibras nerviosas de diferentes tamaños (nervio safeno de gato y de conejo).

Propiedades	Grupo		
	A	B	C
Diámetro de la fibra (μ)	20-1	3	—
Velocidad de conducción (m/seg)	100-5	14-3	2
Duración del potencial de acción (m/seg)	0.4-0.5	1.2	2.0
Período refractario absoluto (m/seg)	0.4-1:0	1.2	2.0

Según Grundfest, 1940. *Ann. Rev. Physiol.* 2.

Estructura del axoplasma. Neurofibrillas y neurótubulos

Con el microscopio óptico es posible distinguir, en las preparaciones fijadas y coloreadas, filamentos contenidos en el citoplasma de las células a los que se denomina *neurofibrillas*. Estas parten del pericarion en todas direcciones y se continúan en las dendritas, el axón y la fibra nerviosa (fig. 24-4). Aunque las fibrillas se han evidenciado en células ganglionares cultivadas *in vitro*, en general no son visibles en las células vivientes, incluso utilizando iluminación de fondo oscuro. Ello dio motivo a controversias respecto del verdadero significado de las neurofibrillas y llevó a algunos a pensar que eran artificios debido a la fijación. Esas controversias tienen ahora sólo un interés histórico.

La observación con el microscopio de polarización del axoplasma viviente en fibras gigantes del calamar, puso de manifiesto una birrefringencia positiva débil, que indica la presencia de un material submicroscópico

orientado a lo largo del eje de la fibra.⁵ El axoplasma de fibras nerviosas mielínicas fue separado de la vaina de mielina, lo cual permitió su estudio directo con el microscopio electrónico y el de polarización (figura 24-5, A).^{6, 7} Por el análisis de la birrefringencia de forma y por la microscopia electró-

nica se determinó que el volumen parcial ocupado por el material orientado axilmente era menor del 1 por ciento (0.7 y 0.6 por ciento, respectivamente).

En el axoplasma aislado, el microscopio electrónico reveló un material fibrilar constituido por fibrillas de longitud indefinida, de

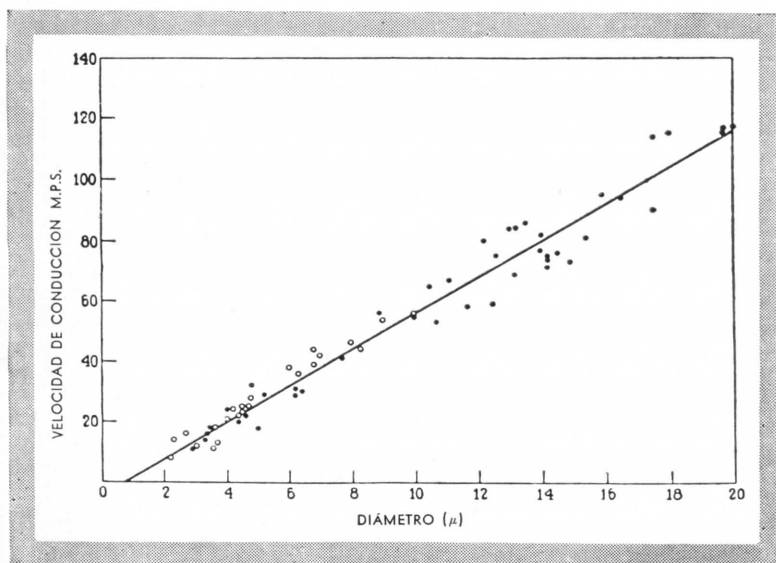


FIG. 24-3. *Relación lineal, entre el diámetro y la velocidad de conducción, en una fibra nerviosa mielínica de mamífero. Los puntos representan nervios completamente desarrollados; los círculos, nervios inmaduros. (De Hursh, tomado de Gasser, 1941, Ohio, J. Sci., 41, 145.)*

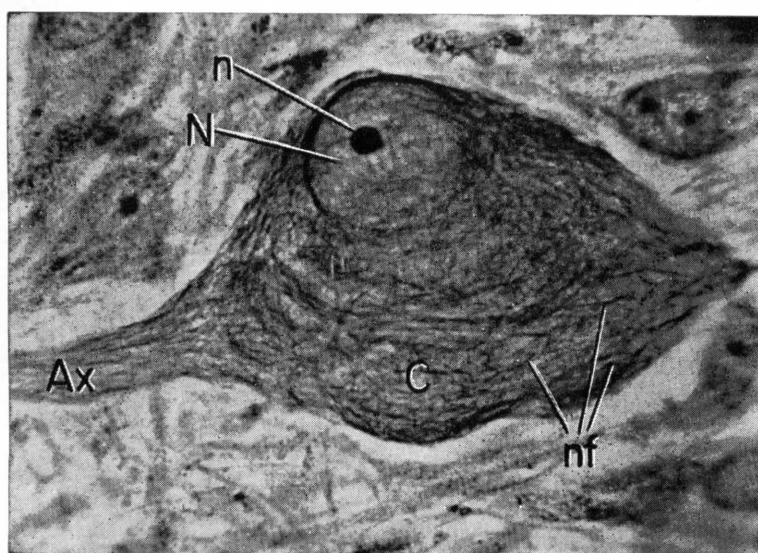


FIG. 24-4. *Célula nerviosa que revela las neurofibrillas (nf) dentro del soma y del axón (Ax). n Nucléolo; N, núcleo; C, citoplasma. Coloración argéntica, microscopio óptico. (Cortesía de W. Hild.)*

contorno liso y un diámetro de 100 a 400 Å (fig. 24-5, B).⁶ En cortes de fibras nerviosas periféricas mielínicas y amielínicas se encontró, además del material fibrilar, mitocondrias, cadenas de canaliculos, vesículas del retículo endoplásmico y unos pocos ribosomas.⁷

En los últimos años, el estudio de cortes finos de tejido nervioso ha demostrado que el material fibrilar presente en el axón, dendritas y pericarion está compuesto por elementos tubulares alargados de 200 a 300 Å de diámetro —los *neurotúbulos*—, que corresponden a las fibrillas más gruesas halladas en el axoplasma aislado y, previamente, en nervios homogeneizados (fig. 24-5, C).^{6, 8}

La figura 24-6, A representa fibras nerviosas amielínicas en las cuales se ven muchos neurotúbulos en corte trasversal apreciándose su configuración anular. Entre ellos se encuentran también neurofilamentos seccionados trasversalmente. Estos dos componentes estructurales del axón aparecen con mayor aumento en la figura 24-6, B y C. La pared de los neurotúbulos presenta una subunidad cuya estructura es semejante a la de los microtúbulos (véase cap. 22). Se han descrito neurotúbulos con una zona central densa (fig. 24-6, C),⁹ interpretada como el resultado de la migración intraluminal de algunos productos.¹⁰ En los neurofilamentos se reconocieron excrescencias o brazos laterales.¹⁰ Los neurotúbulos pudieron ser aislados, asimismo, del cerebro de los mamíferos.¹¹ La mayor parte de los conceptos bioquímicos y fisiológicos expuestos en el capítulo 22 para los microtúbulos, probablemente sean aplicables a los neurotúbulos. Existen estructuras tubulares en muchas células sensoriales en las que diferentes tipos de energía (mecánica, química, térmica) son transformadas en impulsos nerviosos (para una noción general sobre las proteínas fibrosas neuronales, véase¹²). Aunque tanto los neurotúbulos como los neurofilamentos están muy debajo del poder de resolución del microscopio óptico, cuando se aglutinan por la acción de los fijadores y con el agregado de coloides argénticos, forman las neurofibrillas de la histología clásica (figura 24-4).

Si bien fueron descritas hace más de un siglo, se desconoce prácticamente el significado de las neurofibrillas. No obstante, puede descartarse por completo la hipótesis de que están vinculadas con la conducción nerviosa. En efecto, los neurotúbulos son muy sensibles

a la degeneración walleriana⁸ y a la puromicina,¹⁴ y se destruyen antes de la desaparición de la conducción nerviosa.¹³ Ya hemos mencionado (véase cap. 21) que después de la expulsión del axoplasma en el axón gigante del calamar y su reemplazo por una solución salina, subsiste una conducción normal del impulso nervioso. No cabe ahora ninguna duda de que la conducción nerviosa ocurre en la superficie de la membrana del axón (véase más adelante). La hipótesis de que las neurofibrillas son así elementos tróficos del axón,¹⁵ puede adquirir algún significado si se tiene en cuenta el concepto moderno de crecimiento axónico y de síntesis de materiales esenciales para la acción trófica o la transmisión sináptica a nivel de las terminaciones.

Es posible que el proceso de crecimiento axónico implique la formación y migración de los neurotúbulos y neurofilamentos, y que este material tubular transporte sistemas enzimáticos esenciales y otros componentes utilizados en las terminaciones para la formación de vesículas sinápticas y transmisión del impulso nervioso.¹⁶ En el cabo proximal de un axón en vías de regeneración pueden observarse neurotúbulos formando vesículas, algunas de las cuales contienen una zona central densa.¹⁷

Conducción del impulso nervioso

Para el estudio de los fenómenos físico-químicos inherentes a la conducción del impulso nervioso, el lector deberá consultar los tratados de Fisiología general.^{18, 21} Aquí se hará solamente una descripción somera como complemento de lo expresado sobre *transporte activo y potenciales de membrana* en el capítulo 21. Se recordará lo referido entonces acerca del potencial estable o de reposo y los flujos iónicos de Na⁺ y K⁺. El bombeo hacia fuera del Na⁺ (la denominada bomba de sodio) es el principal mecanismo para mantener un potencial estable negativo dentro de la membrana (fig. 21-5 y tabla 21-1).

Cuando se estimula un músculo o una fibra nerviosa, tiene lugar un profundo cambio en las propiedades eléctricas de la membrana y en el potencial de reposo. Así, la resistencia eléctrica en el axón del calamar descende de 100 a 25 ohms por cm², lo cual indica un aumento de la permeabilidad a los iones.²²

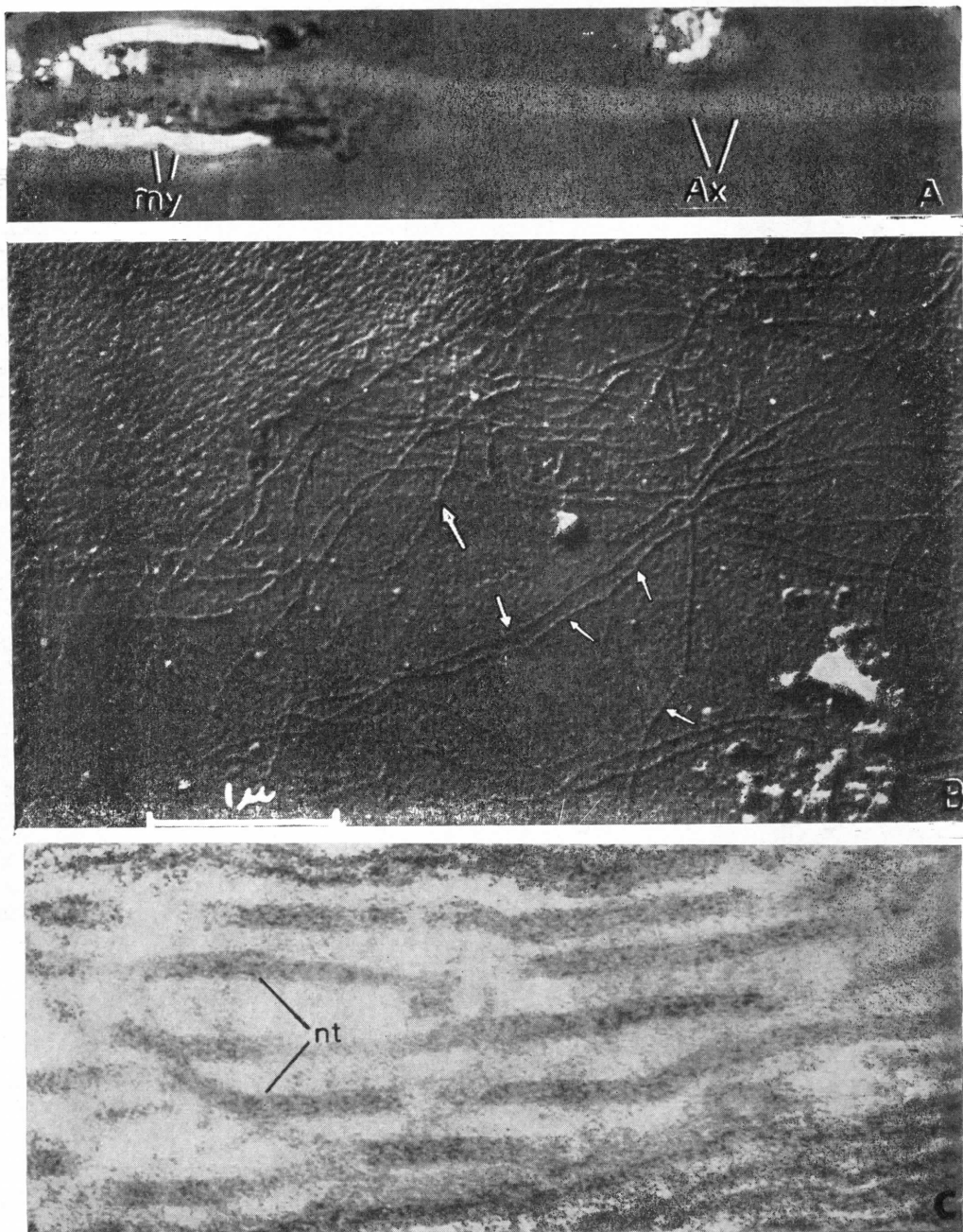


FIG. 24-5. A Axón (Ax) separado de una fibra mielínica y observado con el microscopio de polarización. Obsérvese la débil birrefringencia positiva. Con un tratamiento apropiado se puede demostrar que la refringencia es tanto de forma como intrínseca. my Mielina con fuerte birrefringencia. En la fibra normal la birrefringencia del axón está oscurecida por la de la vaina de mielina. (De W. Thornburg y E. De Robertis, 1956.) B Material fibrilar (neurotúbulos y neurofilamentos), observado con el microscopio electrónico, de un axón despojado de la vaina de mielina y comprimido. Preparación sombreada con cromo. Se indican con flechas algunos neurotúbulos. 26,000 $\times$. (De E. De Robertis y C. M. Franchi, 1953). C Neurotúbulos orientados longitudinalmente (nt). 120,000 $\times$. (Cortesía de E. L. Rodríguez Echandía, R. S. Piezzi y E. M. Rodríguez.)

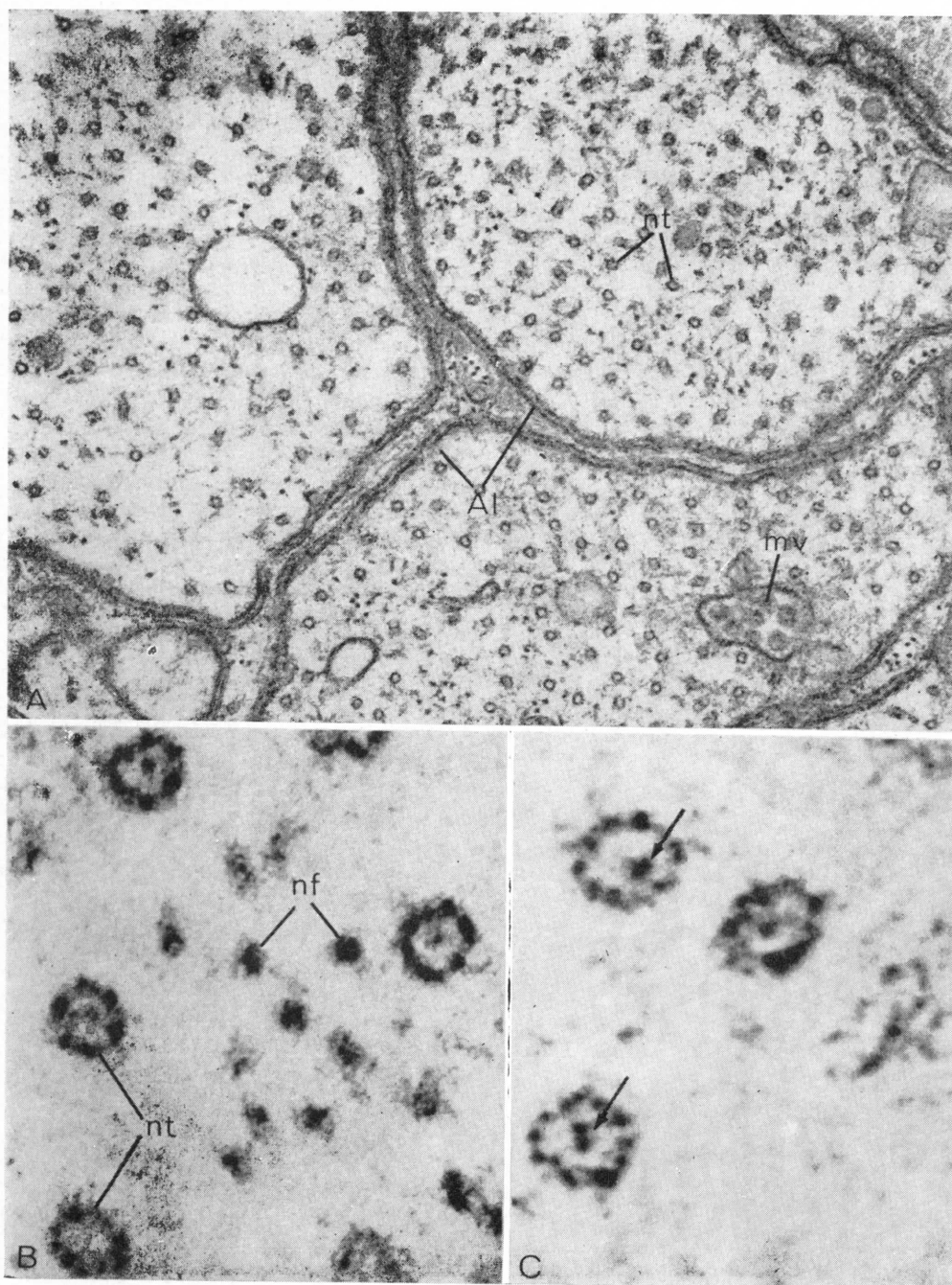


FIG. 24-6. A Corte de un nervio amielínico que pone de manifiesto el axolema (Al), los neurotúbulos (nt) y un cuerpo multivesicular (mv). 60,000 $\times$. B Con mayor aumento se observan neurofilamentos (nf) y neurotúbulos (nt). 400,000 $\times$. C Se indican con flechas los neurotúbulos que contienen gránulos en su luz. 600,000 $\times$. (Cortesía de E. L. Rodríguez Echandía, R. S. Piezzi y E. M. Rodríguez.)

Por medio de un registro intracelular (fig. 24-7) se advierte que, con la excitación, el potencial de reposo cambia súbitamente de -90 mV a $+50$ mV; es decir, no sólo existe una despolarización con pérdida de carga, sino que también el potencial se hace positivo en el interior (*overshoot*). En el caso particular de la figura 24-7, la amplitud total del potencial de acción es de 140 mV. Con marcadores radiactivos pudo comprobarse que en el momento de la estimulación se produce una repentina permeabilidad al Na^+ , que aumenta varios cientos de veces y alcanza su máximo en 100 microsegundos.²³ Al finalizar este período la membrana se vuelve nuevamente impermeable al Na^+ , pero la permeabilidad al K^+ aumenta y este ión sale de la célula, repolarizando la fibra nerviosa. En otras palabras, durante la fase de elevación del potencial de acción, se verifica la entrada de Na^+ y en la fase descendente, la salida del K^+ . Mientras que los acontecimientos que se suceden durante el potencial de acción son extremadamente rápidos, la restauración del equilibrio iónico toma un tiempo más prolongado después del fenómeno eléctrico (fig. 21-6).

El potencial de acción que se desarrolla en la fibra nerviosa posee diversas características. El estímulo suscita una pequeña despolarización localizada en la fibra que, después de llegar a cierto *umbral de activación* (figu-

ra 24-7), produce potenciales de acción de igual amplitud. Si se aumenta la intensidad del estímulo, la altura del potencial de acción siempre permanece igual. Esta propiedad se denomina *respuesta todo o nada*. Otra propiedad del impulso nervioso es la de *no decrecer*; ello significa que la amplitud del potencial de acción no disminuye y es la misma a todo lo largo de la fibra nerviosa. Este tipo de potencial está bien adaptado para la conducción a través de largas distancias sin pérdidas (fig. 24-1).

Una vez que ha pasado un impulso a través de cualquier punto de la fibra comienza allí un *período refractario*, durante el cual no puede reaccionar a otro estímulo.

La *propagación* del impulso nervioso se explica generalmente por la *teoría del circuito local* (fig. 24-8). En el momento de la estimulación el área se despolariza (se vuelve negativa afuera) y actúa como una cavidad hacia donde fluye la corriente desde las áreas contiguas (fig. 24-8, B y C). Esta onda de despolarización avanza a lo largo de la fibra nerviosa con una velocidad de conducción característica para cada fibra (tabla 24-1 y fig. 24-3). Mientras la onda de despolarización progresa, la repolarización es tan rápida que sólo una parte de la fibra (unos pocos milímetros o unos centímetros, según la velocidad de conducción) permanece despolar-

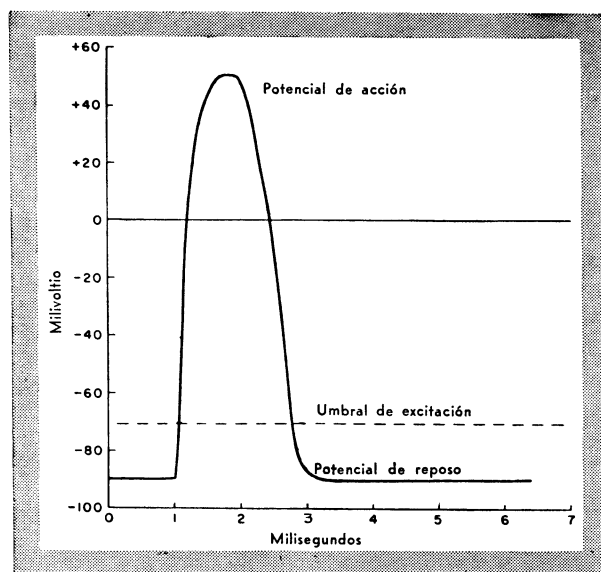


FIG. 24-7. *Potencial de acción registrado de una sola placa eléctrica del pez Electrophorus electricus. En este caso el potencial de acción es similar o superior al de la mayoría de los axones. (De Gerebtzoff y Schoffeniels.)*

zada en un tiempo dado. En el período de recuperación, el Na^+ abandona la célula por acción de la bomba de sodio y el K^+ vuelve a entrar para restablecer el equilibrio. Esta recuperación se produce muy probablemente a expensas de las uniones fosfato de alta energía. Sin embargo, los impulsos pueden continuar su descarga por algún tiempo en ausencia de O_2 y aun con inhibición de la glucólisis, lo cual significa que en la membrana estarían acumuladas uniones de alta energía (ATP).

Conducción saltatoria

Aun cuando la teoría precedente acerca de la conducción nerviosa es aplicable a fibras amielínicas, en las mielínicas se presume que los circuitos locales se forman sólo a la altura de los nodos (fig. 24-8, D).

De acuerdo con esta teoría, denominada

saltatoria, los impulsos son conducidos electroticamente a nivel de los internodos, en tanto que en cada nodo el potencial de acción es elevado a la misma altura por medio de mecanismos iónicos. De esta manera, la cantidad de Na^+ y K^+ intercambiado se reduce en gran parte y el trabajo requerido es mucho menor.

La velocidad de conducción, conforme a lo expresado en otro párrafo, está relacionado con la distancia entre los nodos y ésta, a su vez, con el diámetro de la fibra. Si se estimulan fibras nerviosas mielínicas con finos electrodos, es posible comprobar que en los nodos el umbral de estimulación es mucho más bajo (es decir, la sensibilidad es mayor) que en los internodos. Se ha encontrado que el impulso nervioso es capaz de saltar a través de un nodo anestesiado, pero no a través de dos de ellos. En este caso, el tercer nodo está fuera de la influencia del campo eléc-

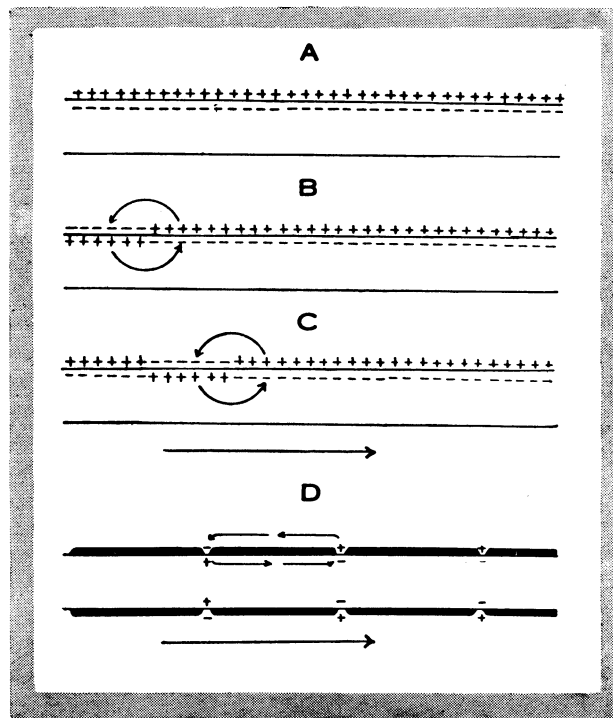


FIG. 24-8. Esquema que ilustra la teoría del circuito local de propagación del potencial de acción (A, B, C) en neuronas amielínicas y en fibras musculares, en comparación con la conducción saltatoria en fibras mielínicas (D). A Membrana de una fibra nerviosa (o muscular) no excitada. B Membrana celular excitada en un extremo. C Movimiento del potencial de acción, seguido de recuperación. D Conducción saltatoria de nodo a nodo. En las fibras nerviosas de gran calibre el intercambio iónico que se produce durante un impulso en la conducción saltatoria es cien veces menor que el que tiene lugar en la fibra amielínica. Las flechas en C y D indican la dirección de la propagación del impulso. (De Hodgkin, 1957: Proc. Roy. Soc. Biol., 148, 1.)

trico. Los hallazgos precitados indican que en el internodo el potencial es conducido electrotónicamente.

Respuestas graduadas en la neurona. Potenciales generadores y sinápticos

Los estudios fisiológicos demostraron que, además de la respuesta todo o nada, en el tejido nervioso existe otro tipo de actividad eléctrica. Ésta es, con mucho, la más frecuente en el sistema nervioso central y se la conoce como *respuesta graduada*.

En la respuesta graduada, característica de los receptores y de las sinapsis (fig. 24-1), el impulso no se *propaga* y la *amplitud* varía con la intensidad del estímulo. Tanto los *potenciales generadores* hallados en los receptores como los *potenciales sinápticos* constituyen respuestas graduadas.

Cuando un receptor periférico, como el

corpúsculo de Pacini o un receptor de tensión (huso neuromuscular) es estimulado mecánicamente —en la terminación distal de la fibra sensorial— se registra un potencial local, graduado y decreciente, cuya amplitud y duración dependen de la intensidad y duración del estímulo.²⁵

En el caso del corpúsculo de Pacini, se pueden extraer la mayoría de las laminillas conectivas que rodean la terminación nerviosa sin alterar el potencial generador. Parece, pues, que el *trasductor biológico* susceptible de transformar la energía mecánica (presión) en energía eléctrica (potencial generador) se localiza en la parte sensorial de la terminación (fig. 24-9). Probablemente la deformación mecánica de la terminación produce una modificación en la permeabilidad de la membrana, con entrada de iones y despolarización parcial. Este cambio eléctrico local se denomina a menudo *potencial genera-*

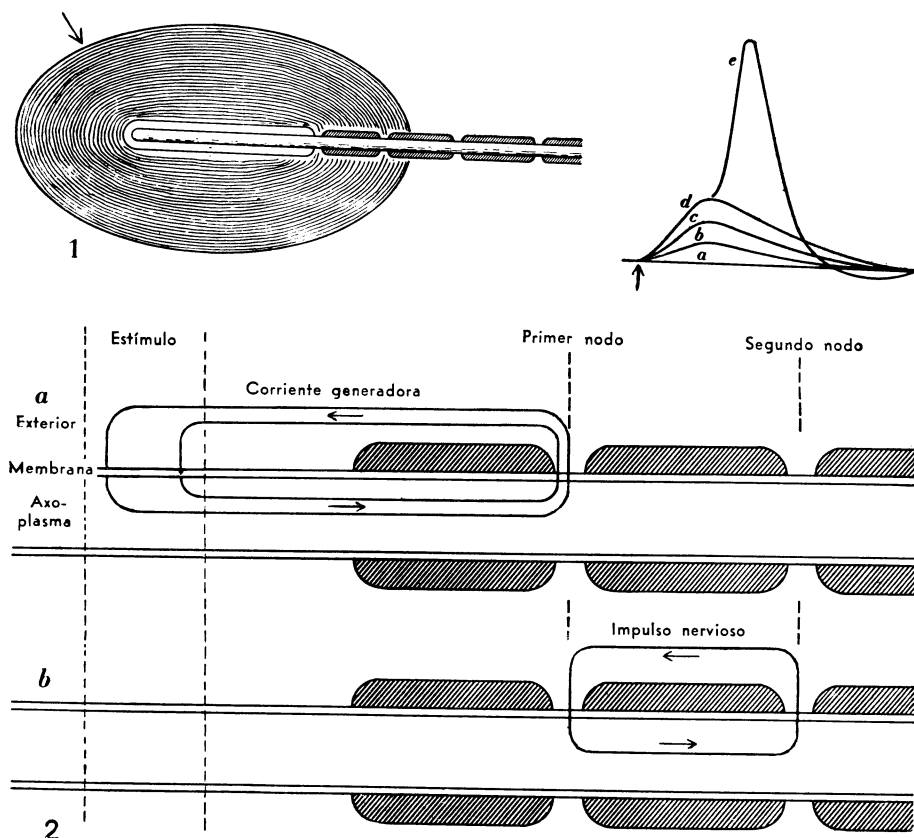


FIG. 24-9. 1 Corpúsculo de Paccini con la terminación nerviosa rodeada de múltiples laminillas. El estímulo a nivel de la flecha suscita un potencial generador que aumenta en amplitud (a-d) hasta que produce un impulso nervioso "todo o nada" (e). 2 Mecanismo de trasducción. El estímulo ocasiona una caída en la resistencia de la membrana con transferencia iónica. Véase la corriente generadora inducida por el estímulo (a) y el impulso nervioso (b) que se origina en el primer nodo. (Cortesía de W. R. Loewenstein.)

dor, porque si llega a un umbral determinado puede ocasionar la despolarización ulterior de la fibra y ser el comienzo de un potencial de acción propagado (fig. 24-9). En el corpúsculo de Paccini, el impulso nervioso comienza en el primer nodo de Ranvier.²⁶

La intensidad del estímulo sensorial se refleja por la amplitud del potencial generador y éste a su vez por la *frecuencia* de la señal propagada (cuanto más intenso es el potencial generador mayor es la frecuencia). De ese modo, la información recibida es codificada para la conducción a lo largo de las fibras nerviosas en forma de un tren o salva de impulsos (fig. 24-1).

TRANSMISIÓN SINÁPTICA

Los conocimientos iniciales acerca de la *sinapsis*, o *contactos sinápticos*, provinieron de los hallazgos realizados a fines del siglo XIX y comienzos del actual sobre la organización morfológica y fisiológica del sistema nervioso.

La *teoría neuronal*, sostenida principalmente por Cajal, se basaba en el supuesto de que la interacción funcional de las células nerviosas ocurría por medio de contigüidades o *contactos funcionales*.

Empleando métodos de impregnación argéntica, se describieron diferentes tipos de terminaciones nerviosas sobre las dendritas o el pericarion, como los característicos botones, las terminaciones "en clava", las denominadas "en cesto" o los contactos *en passant*.²⁷

Sherrington, en 1897, introdujo el nombre de *sinapsis* para explicar las propiedades especiales del arco reflejo, que según él dependían de los contactos funcionales entre las neuronas. Atribuyó a la sinapsis una acción de válvula, tendiente a lograr que los impulsos sean transmitidos en una sola dirección (fig. 24-1). En sus estudios sobre transmisión refleja descubrió algunas de las propiedades fundamentales de la sinapsis, como el *retardo sináptico* (o sea el retardo que el impulso experimenta al atravesar la unión), la fatigabilidad de la sinapsis y su mayor sensibilidad a la reducción de oxígeno y a los anestésicos. También señaló que muchas sinapsis situadas sobre la superficie de una neurona motora podían reaccionar entre sí, y que mientras algunas tenían una acción excitatoria adicional, otras eran inhibitorias y antagonistas de las primeras. En vista de esos conceptos, la unión sináptica fue considerada por Sherrington como un lugar especializado de contacto,

a nivel del cual se transmiten influencias excitatorias o inhibitorias que actúan sobre otras células.²⁸

Las regiones sinápticas constituyen zonas especializadas de contacto entre dos neuronas o entre una neurona y un elemento no neuronal, como pueden ser algunos receptores o una célula efectora (por ejemplo, unión mio-neural). Conforme a ello, la sinapsis engloba todas las regiones "anatómicamente diferenciadas y funcionalmente especializadas para la transmisión de excitaciones e inhibiciones de un elemento al siguiente en una dirección no recíproca".²⁹ Estas sinapsis típicamente polarizadas son la gran mayoría en el sistema nervioso de los vertebrados o invertebrados. Una definición más moderna de sinapsis debería incluir también la existencia de una organización submicroscópica compleja en ambas partes de la unión presináptica y post-sináptica, y la de un mecanismo específico neuroquímico en el que están comprendidos los transmisores, las sustancias receptoras, las enzimas de síntesis e hidrolíticas, etcétera.

Tomando como referencia el esquema de la figura 24-1, se aprecia claramente que el principal problema de la transmisión sináptica consiste en descubrir el mecanismo por el cual la información conducida por una neurona es trasferida a la siguiente. En otros términos, cómo el código de frecuencia transportado por una neurona puede originar un nuevo código de frecuencia en la siguiente.

Transmisión química y eléctrica

Du Bois Reymond (1877) fue el primero en sugerir que la transmisión podía ser de naturaleza *química* o *eléctrica*, y si bien posteriormente se observaron ambos mecanismos, parece ser que la sinapsis química es mucho más frecuente, tanto en el sistema nervioso periférico como en el central.

La *transmisión química* presupone que un mediador químico específico se sintetiza y acumula en la terminación nerviosa, siendo luego liberado por el impulso nervioso. El transmisor altera la permeabilidad iónica del componente postsináptico suscitando un cambio bioeléctrico (*potencial sináptico*). En 1904, Elliot sugirió que los nervios simpáticos actúan por medio de la liberación de adrenalina a nivel de las uniones con el músculo liso. Más tarde pudo comprobarse que el verdadero transmisor adrenérgico era la *noradrenalina*. Los estudios de Nixon (1906) y especialmente los de Dale (1914) confir-

maron la transmisión química en el sistema parasimpático, la que fue probada finalmente por Loewi (1921) en el corazón. A partir de entonces se demostró que la acetilcolina actúa en los ganglios simpáticos, en la placa mioneural y en numerosas sinapsis centrales.

La *transmisión eléctrica* fue evidenciada por primera vez en la sinapsis gigante del ganglio abdominal del cangrejo de río³⁰ y luego en varios otros casos. En este tipo de sinapsis, el contacto de la membrana actúa como un eficaz rectificador eléctrico, permitiendo que la corriente pase con relativa facilidad desde el elemento presináptico al postsináptico, pero no en dirección inversa. La corriente de acción del impulso nervioso que llega, pasa sin retardo y despolariza y excita directamente a la neurona postsináptica. Aquí, la transmisión unidireccional se debe a la resistencia eléctrica —que actúa como una válvula— de las membranas sinápticas puestas en contacto.

Sinapsis excitatorias e inhibitorias.

Potenciales sinápticos

Los estudios fisiológicos sobre la transmisión sináptica se perfeccionaron en gran parte con el empleo de microelectrodos que pueden im-

plantarse cerca de la región sináptica, o intracelularmente, en las neuronas presináptica y postsináptica.³¹ El primer potencial sináptico que se registró en forma directa fue el de la *placa terminal* de la unión mioneural.³²⁻³⁵

Estos registros intracelulares en células nerviosas de grandes dimensiones (neuronas motoras, células piramidales, células ganglionares de invertebrados, etcétera), permitieron observar que la llegada del impulso nervioso presináptico origina un potencial sináptico local.^{28, 36}

Los *potenciales sinápticos*, así como los potenciales generadores, son graduados y no se propagan. Se extienden electrotónicamente sólo por una corta distancia, reduciéndose su amplitud.

Un experimento típico es el que ilustra la figura 24-10, donde intervienen dos células ganglionares de *Aplysia* (un molusco marino), una de las cuales actúa sinápticamente (P) sobre la otra (F). En la neurona P se implantan dos microelectrodos, que se emplean para la estimulación (St) y el registro (R), respectivamente. En la neurona F se coloca un microelectrodo (R) para registrar el potencial sináptico. Se pueden encontrar dos tipos de células P; unas producen

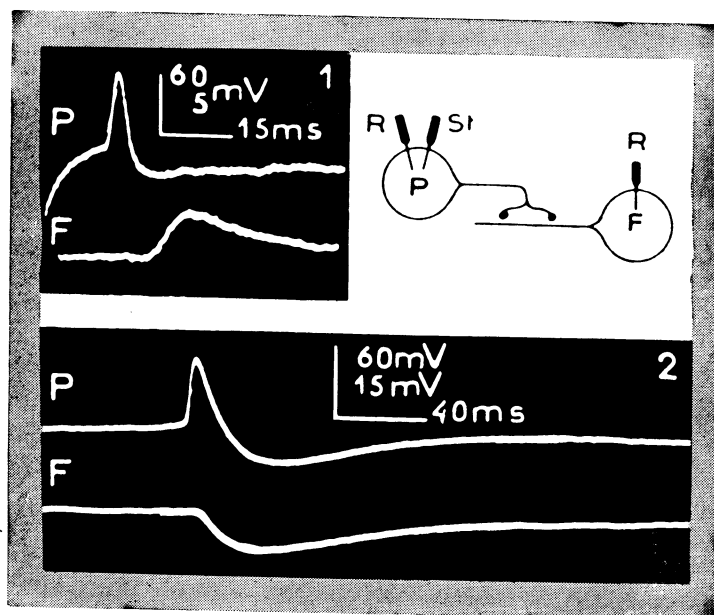


FIG. 24-10. Esquema del experimento en dos células ganglionares de *Aplysia* que están relacionadas por sinapsis. (Véase la descripción en el texto.) 1 Respuesta excitatoria con despolarización de la membrana en F, después de la llegada del potencial de acción a partir de P. 2 Respuesta inhibitoria con hiperpolarización de la membrana en F, después de la llegada del potencial de acción a partir de P. (Cortesía de L. Tauc y H. M. Gerschenfeld.)

potenciales sinápticos excitatorios en la célula F (1) y otras un potencial postsináptico inhibitorio (2).³⁷

Los *potenciales excitatorios* despolarizan la membrana postsináptica, hasta que al llegar a cierto nivel crítico inducen a la neurona a descargar un impulso. El *potencial postsináptico excitatorio* (PPSE) se debe a la acción del trasmisor liberado por la terminación (figura 24-10, 1), que produce un cambio en la permeabilidad de la membrana postsináptica, permitiendo el pasaje de iones pequeños como Na^+ , K^+ y Cl^- (véase cap. 21).

Del mismo modo, las *sinapsis inhibitorias* influyen sobre la membrana postsináptica. En este caso tiene lugar un aumento transitorio del potencial de membrana, denominado *potencial postsináptico inhibitorio* (PPSI) (figura 24-10, 2). El efecto hiperpolarizante provoca una depresión de la excitabilidad neuronal y por consiguiente ejerce una acción inhibitoria.

La acción de excitación y la de inhibición no dependen exclusivamente del tipo de sustancia trasmisora. Así, la acetilcolina es excitatoria en la unión mioneural, ganglio simpático, etcétera, pero es inhibitoria en el corazón de los vertebrados, donde reduce la frecuencia de la contracción. La inyección de acetilcolina en las células de *Aplysia* (fig. 24-11) tiene un efecto sináptico excitatorio en algunas de ellas, produciendo despolarización y aumentando el número de descargas (1), o solamente una despolarización sin descargas (2). En otras células, el mismo tratamiento causa hiperpolarización e inhibición de las descargas espontáneas (3).

Estos fenómenos indican que la naturaleza de una sinapsis se basa particularmente en la reactividad química de la membrana de la neurona postsináptica. El empleo de registros intracelulares ha contribuido enormemente a dilucidar algunos de los mecanismos básicos, por medio de los cuales el código de señales se transmite de una célula a otra. Todos los potenciales sinápticos de diferentes terminaciones excitatorias o inhibitorias que se descargan sobre una neurona, se suman algebraicamente. Ambos tipos de sinapsis modificarán las propiedades eléctricas de la membrana en una zona crítica de la célula con bajo umbral excitatorio.

En esta región, denominada "marcapaso", que en la neurona motora se localiza al nivel del segmento inicial del axón, tiene lugar la descarga de nuevos impulsos.²⁸

Estructura de la región sináptica. Vesículas sinápticas

Los estudios morfológicos con el microscopio óptico revelaron la considerable variación en forma, tamaño y distribución de la sinapsis en las diferentes regiones del sistema nervioso central y periférico.

Las sinapsis se clasifican en *axosomáticas*, *axodendríticas* y *axoaxonicas*, de acuerdo con las relaciones que contraen las terminaciones con los componentes postsinápticos. Dichas terminaciones presentan diversas formas (de botón, de clava, cáliz, etcétera).

En una neurona motora, miles de terminaciones nerviosas finalizan sobre la superficie del pericarion y de las dendritas, y unas pocas sobre el comienzo del axón (fig. 24-12).

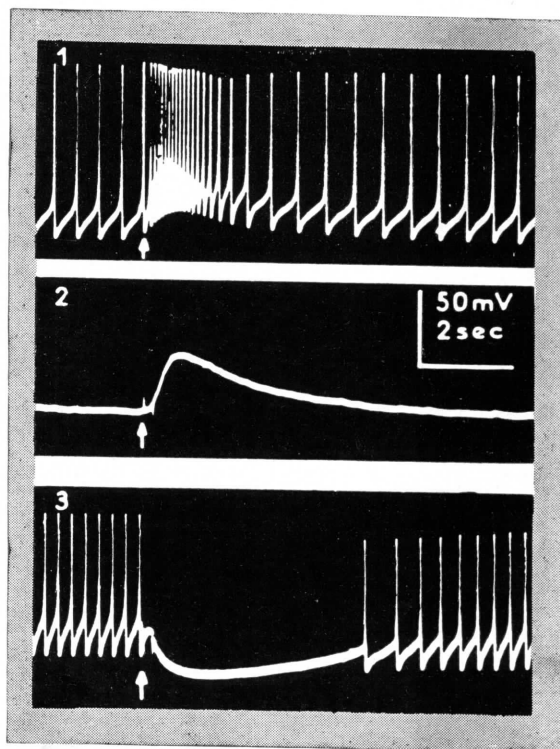


FIG. 24-11. 1 Registro intracelular de una neurona de *Aplysia* (véase fig. 24-10) que produce descargas espontáneas. En el sitio indicado por la flecha se agrega acetilcolina, que causa despolarización y aumento en la frecuencia de la descarga (sinapsis excitatoria). 2 El mismo experimento en una neurona sin descarga. Sólo ocurre una despolarización (potencial sináptico). 3 En esta neurona la acción de la acetilcolina induce la hiperpolarización y la inhibición de las descargas espontáneas. (Cortesía de L. Tauc y H. M. Gerschenfeld.)

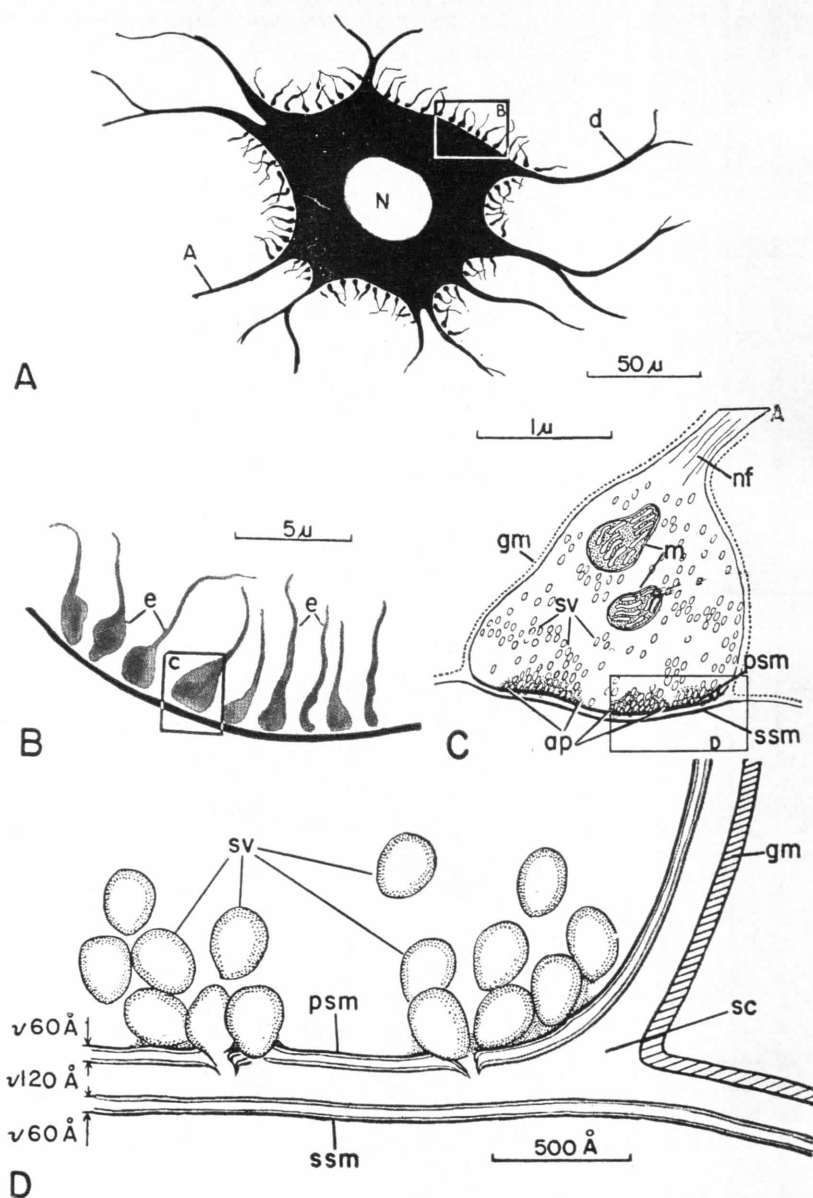


FIG. 24-12. Esquema que ilustra la sinapsis en forma de botón, observada con distintos aumentos por medio del microscopio óptico y del electrónico. A Neurona motora vista con el microscopio óptico; N, núcleo; A, axón, y d, dendritas. Se pueden apreciar los contactos sinápticos en la superficie del soma (sinapsis axosomática) y en la superficie de las dendritas (sinapsis axodendrítica). La porción B está aumentada 10 veces en B. B Pie terminal (e) visto con mayor aumento mediante el microscopio óptico. Los axones aferentes se hallan ensanchados en la terminación. Se indica la presencia de mitocondrias. La porción C se encuentra aumentada 6 veces en C. C Esquema de un pie terminal visto con el microscopio electrónico; m, mitocondria; nf, neuroprototofibrillas; sv, vesículas sinápticas. Se observan tres grupos de vesículas sinápticas adheridas a la membrana presináptica (psm); probablemente constituyen puntos activos (ap) de la sinapsis. Tanto la membrana presináptica como la subsináptica (ssm) presentan mayor densidad electrónica. La membrana glial aparece limitada por una línea de puntos (gm). La porción D se halla aumentada alrededor de 20 veces en D. D Esquema de la membrana sináptica como se observa con el microscopio electrónico de alta resolución (véase descripción en el texto). Algunas vesículas sinápticas (sv) están adheridas a la psm y se abren en la hendidura sináptica (sc).

(De E. De Robertis, 1959.)

Se ha calculado que cerca de 10.000 terminaciones hacen sinapsis sobre una sola célula piramidal de la corteza, lo que da idea de la extraordinaria complejidad del sistema nervioso. Este inmenso número de sinapsis transporta la información proveniente de muchas otras neuronas, algunas de las cuales tienen efecto excitatorio y otras inhibitorio. De ese modo, la neurona se transforma en un verdadero centro, donde toda la información se recoge, se integra y se envía en forma de nuevos impulsos nerviosos a lo largo del axón.

Con el aumento del poder de resolución del microscopio electrónico aparecieron nuevos detalles estructurales (véase fig. 24-12). En la unión sináptica se visualizan las membranas de las dos neuronas, separadas solamente por la hendidura sináptica. De gran

interés bioquímico y fisiológico fue la demostración de que en las terminaciones presinápticas existe un componente vesicular especial, *las vesículas sinápticas*.^{38, 39}

La disposición general de las vesículas sinápticas y la relación que ellas tienen con las membranas sinápticas se ilustran en las figuras 24-12 y 24-13. Las vesículas sinápticas poseen un diámetro de 400 a 500 Å y una membrana limitante de 40 a 50 Å.^{40, 43}

Están distribuidas por toda la terminación, pero tienden a reunirse y tomar contacto íntimo con la membrana presináptica a nivel de ciertos puntos, que probablemente son los *puntos activos* de la sinapsis.

Desde que se observaron por primera vez, se supuso que las vesículas podían ser los lugares de almacenamiento de la acetilcolina

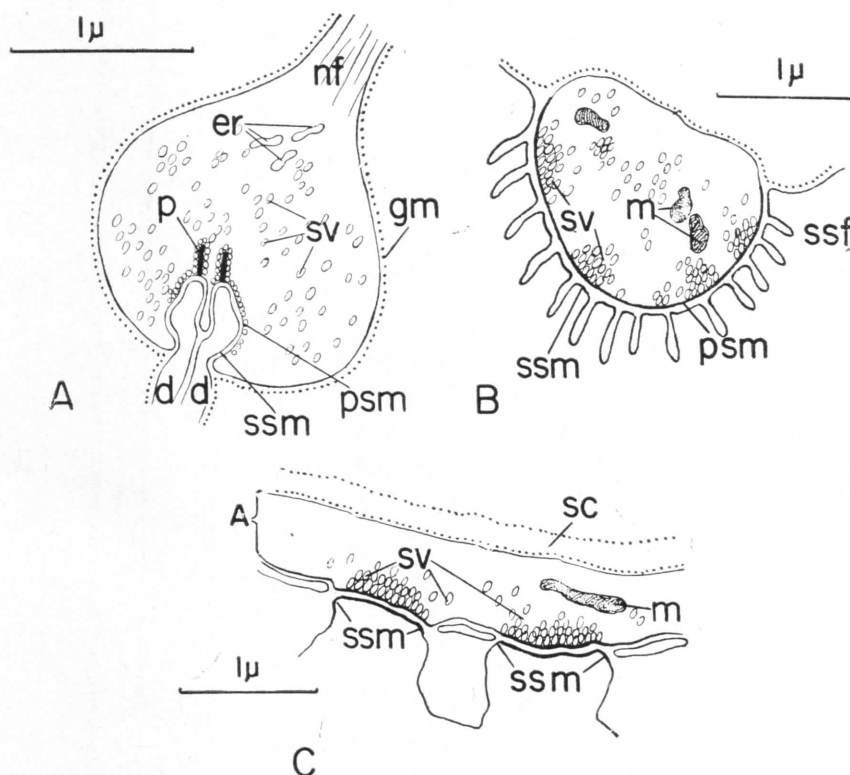


FIG. 24-13. Esquema de diversos tipos de uniones sinápticas. A Sinapsis entre un bastón y una célula bipolar de la retina (véase descripción en el texto); psm, membrana presináptica; d, dendritas de la célula bipolar; er, retículo endoplásmico; gm, membrana glial; ssm, membrana subsináptica; sv, vesículas sinápticas. La característica principal de esta sinapsis es la invaginación de la psm y la penetración de la dendrita en la terminación. B Unión neuromuscular. Se indican varios puntos activos sobre la psm. La diferencia principal con otras sinapsis es el plegamiento de la ssm, que forma los pliegues subsinápticos (ssf); m, mitocondrias (véase la descripción en el texto). C Tipo de unión lateral entre el axón (A) y una placa eléctrica del órgano eléctrico de la anguila. Las vesículas sinápticas se encuentran a lo largo del axón en los puntos de contacto sináptico; sc, célula de Schwann. (De E. De Robertis, 1959.)

y otros transmisores, hecho que se ha probado recientemente mediante el aislamiento de aquéllas.^{44, 45} Se ha sugerido también que podrían desplazarse y perforar la membrana presináptica, descargando su contenido en la hendidura sináptica.^{16, 46}

La figura 24-13 representa otros tres tipos de sinapsis que se ven con el microscopio electrónico; difieren del ya descrito en la relación de las membranas sinápticas.

Membranas sinápticas

En la unión sináptica, ambas membranas parecen ser más gruesas y densas. Otras complejidades de esta región de contacto se ejemplifican en las figuras 24-14 y 24-15. La hendidura sináptica, en la mayoría de las sinapsis corticales, es de alrededor de 300 Å, o sea, más grande que los espacios entre las otras

membranas y puede evidenciar un sistema de finos filamentos *intersinápticos* de alrededor de 50 Å, que unen ambas membranas sinápticas (fig. 24-14).

Se ha observado un sistema distinto de filamentos o canalículos delgados que penetran a distancias variables en las células postsinápticas y que recibe el nombre de *retículo subsináptico*.⁴⁷ El hallazgo de filamentos intersinápticos entre las membranas confirma la existencia de una mayor adhesión en la sinapsis, hecho que se sabía por experimentos de microdissección. En efecto, en una célula aislada, los axones se separan fácilmente de sus terminaciones, pero éstas en cambio permanecen adheridas a las células.

En las *sinapsis eléctricas* hasta ahora estudiadas con el microscopio electrónico, la hendidura es mucho más pequeña que en las otras sinapsis y, probablemente, virtual.^{48, 49}

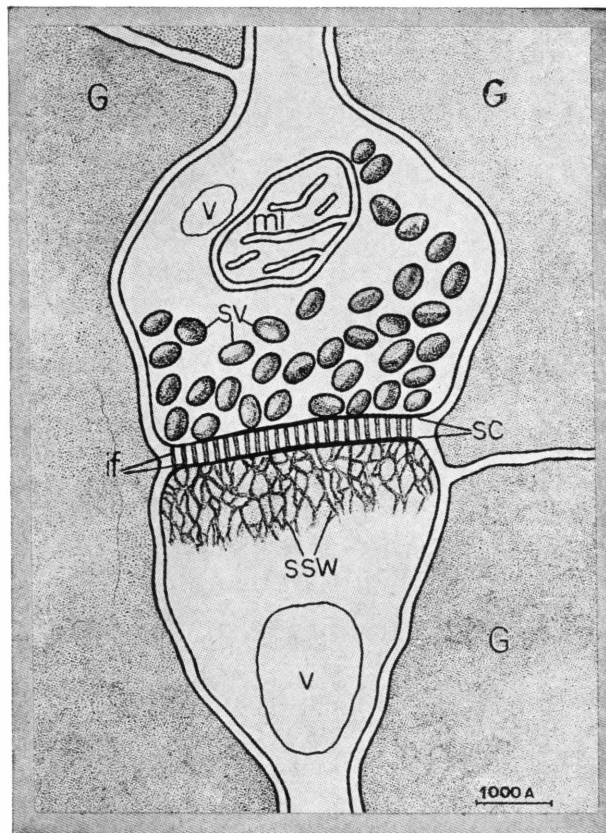


FIG. 24-14. Nuevo esquema de la sinapsis basado en estudios sobre el cerebro. Arriba. Componente sináptico con una mitocondria (mi), una vacuola (v) y numerosas vesículas sinápticas (sv). La hendidura sináptica (sc) es atravesada por filamentos intersinápticos paralelos. Véase el retículo subsináptico (ssw) en el componente postsináptico; G, prolongaciones gliales. (De E. De Robertis y col., 1961.)

Se considera en la actualidad que las uniones estrechas (véase cap. 9), en las cuales hay verdadera adherencia de las membranas, son las bases estructurales de las sinapsis eléctricas.⁵⁰

Vesículas sinápticas adrenérgicas

Un tipo especial de vesículas sinápticas se ha descrito en los axones del simpático, en terminaciones de la glándula pineal y en los nervios esplénicos.⁵¹ Contienen un gránulo muy denso formado por un depósito de osmio reducido (fig. 24-16) y son similares, aunque mucho más pequeños, a los gránulos de catecolamina de la médula suprarrenal (fig. 25-4).

Con agentes farmacológicos que liberan a las catecolaminas, como la reserpina, amamina y otros, se ha observado un vaciamiento de las vesículas granuladas. La concentración de ellas aumenta, en cambio, con inhibidores de la enzima monoaminooxidasa (por ejemplo, iproniazida) o cuando el animal recibe precursores de la catecolamina (DOPA, dopamina).⁵² Todos estos resultados indican que las

vesículas granuladas contienen el trasmisor adrenérgico.

Vesículas sinápticas y unidades cuánticas en la transmisión

Diversos experimentos se llevaron a cabo para demostrar el posible papel de las vesículas sinápticas en la transmisión. En las sinapsis centrales, la sección del nervio produce una degeneración temprana, con aglomeración y lisis de las vesículas.⁴⁶ Observaciones similares se han efectuado en las placas mioneurales degeneradas.^{53, 54}

Mediante la estimulación eléctrica de las terminaciones nerviosas en la médula suprarrenal se demostró que, aplicando frecuencias con las cuales se obtiene la máxima liberación de catecolaminas, el número de vesículas aumenta y que éstas tienden a desaparecer cuando las frecuencias son mucho mayores (fig. 24-17). De ello se deduce que las vesículas sinápticas intervienen en la transmisión del impulso nervioso y que existe un equilibrio entre la formación de vesículas y su descarga a nivel de la sinapsis.

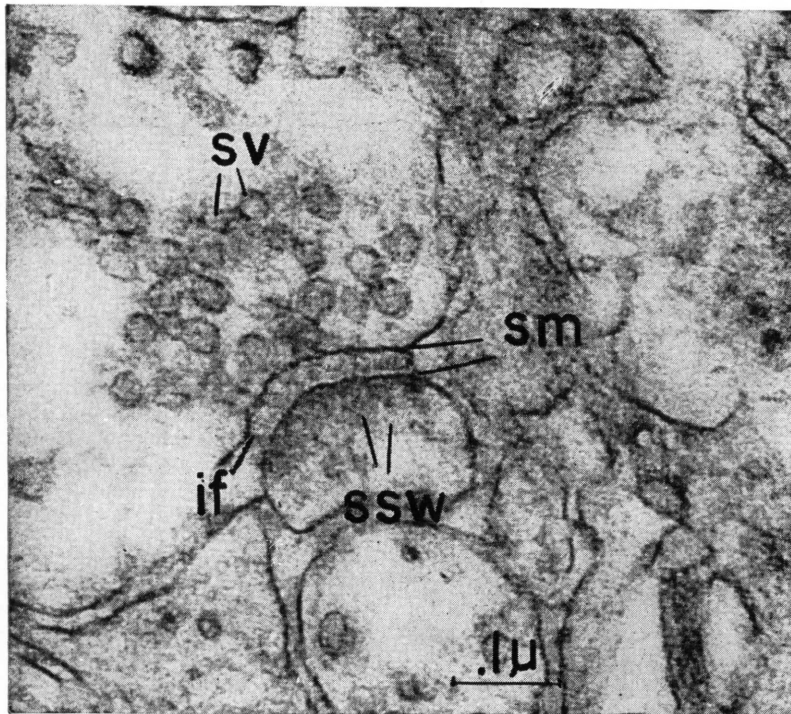


FIG. 24-15. Fotomicrografía electrónica de una sinapsis del núcleo amigdalino de la rata mostrando los componentes sinápticos descritos en la figura 24-14. sm Membrana sináptica. 140,000 $\times$. (De E. De Robertis y Pellegrino de Iraldi.)

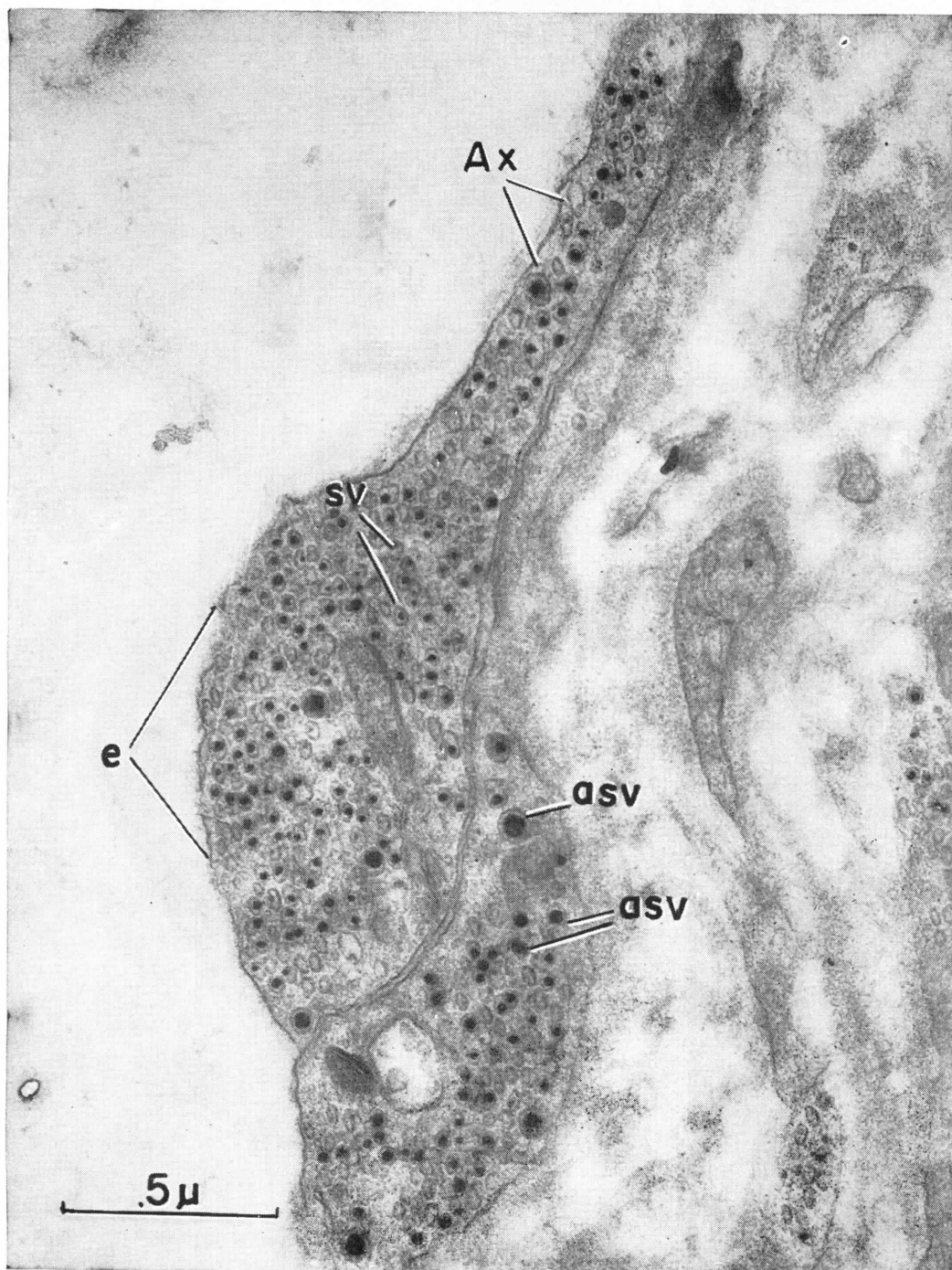


FIG. 24-16. Fotomicrografía electrónica de un axón adrenérgico (Ax) y de la terminación nerviosa adrenérgica (e) en la glándula pineal de la rata. Ambos están llenos de vesículas (sv), muchas de las cuales contienen un depósito de osmio reducido (asv). Estas son las vesículas adrenérgicas. 60,000 $\times$. (De Pellegrino de Iraldi y E. De Robertis.)

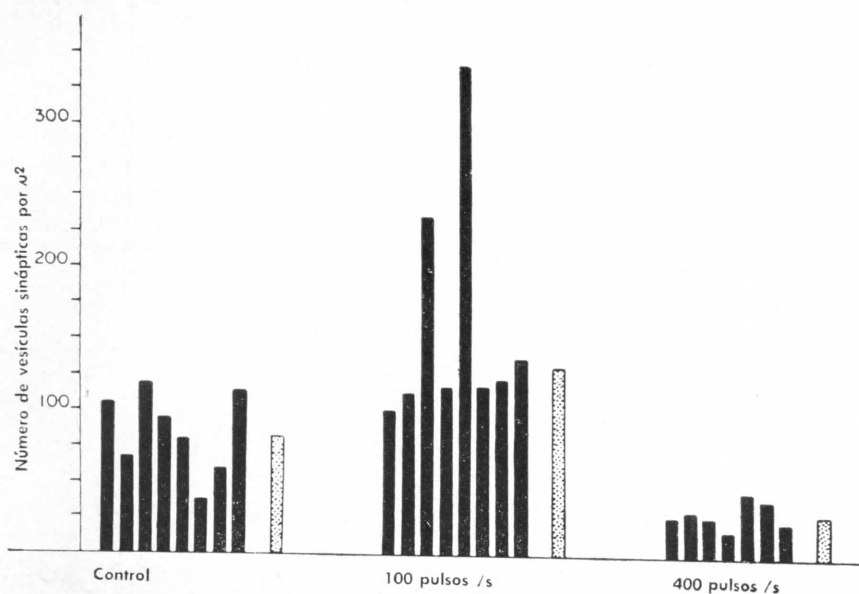


FIG. 24-17. Esquema que muestra la cantidad de vesículas sinápticas por micrón cuadrado contenidas en las terminaciones sinápticas de animales testigos y de conejos después de la estimulación del nervio esplácnico a 100 y 400 impulsos por segundo durante 10 minutos. (De E. De Robertis, 1959.)

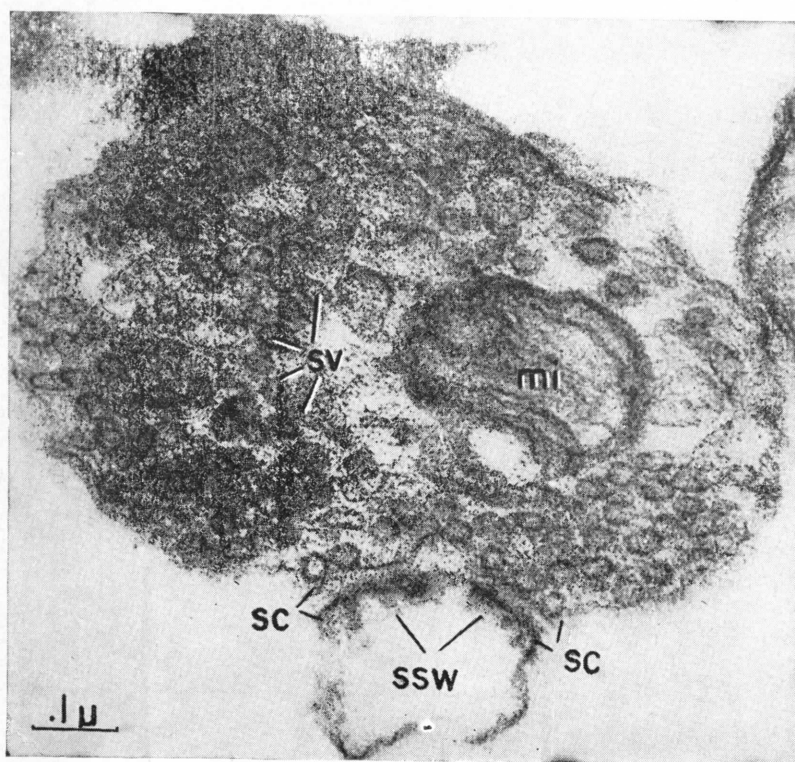


FIG. 24-18. Terminaciones nerviosas aisladas en la fracción mitocondrial del cerebro con los mismos componentes que en la figura 24-14. (De E. de Robertis y col.⁴⁴)

Los estudios fisiológicos pusieron de manifiesto que los dos tipos esenciales de acciones sinápticas —la excitatoria y la inhibitoria— son debidos a un flujo de iones a través de la hendidura sináptica, que lleva a la despolarización o a la hiperpolarización de la membrana sináptica. Este flujo iónico es precedido de la descarga de trasmisor químico en la hendidura sináptica.²⁸

La placa mioneural presenta una actividad eléctrica espontánea en forma de *potenciales*

de placa en miniatura, que son mil veces más pequeños que el potencial sináptico.⁵⁵ Se ha formulado la hipótesis de que los micropotenciales se originan por la liberación espontánea de unidades multimoleculares (o cuánticas) de acetilcolina sobre la membrana sináptica. Con el descubrimiento de las vesículas sinápticas cobró vigencia la teoría de que la acetilcolina y otros trasmisores son secretados dentro de paquetes rodeados de una membrana y que, en realidad, *cada vesícula si-*

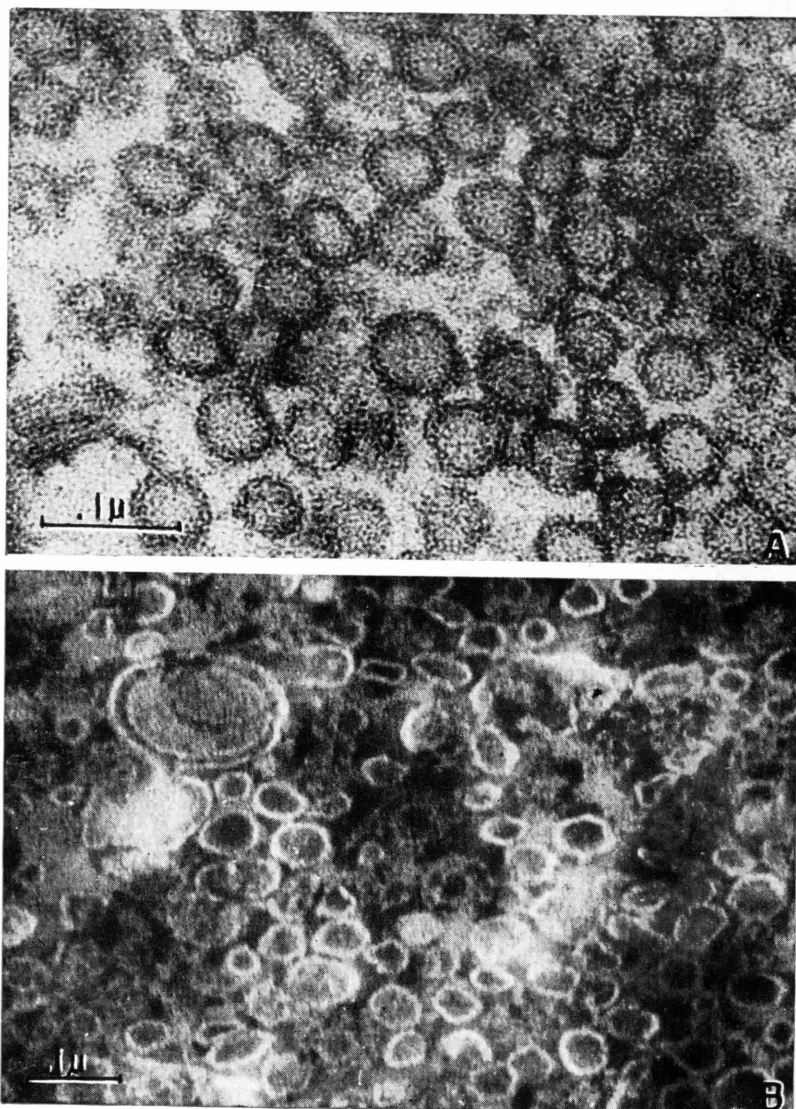


FIG. 24-19. A Fotomicrografía electrónica, con gran aumento, de las vesículas sinápticas del hipotálamo de la rata. Se aprecia la ultraestructura de la membrana vesicular. 180,000 $\times$. B Vesículas sinápticas aisladas del cerebro de la rata después del shock osmótico de la fracción mitocondrial. Coloración negativa con fosfotungstato. 120,000 $\times$. (De E. De Robertis y col., 1963.)

náptica representa una unidad cuántica del trasmisor. Conforme a esta tesis, con la llegada del impulso nervioso, se pondrían en libertad simultáneamente varios cientos de vesículas sinápticas que liberarían acetilcolina produciendo el potencial sináptico (potencial de placa terminal).¹⁶

Aislamiento de terminaciones nerviosas y vesículas sinápticas

Sistema de la acetilcolina

Debido a la extraordinaria complejidad del sistema nervioso central, nuestros conocimientos acerca de los mecanismos de transmisión química son muy insuficientes. En los últimos años, con la aplicación de métodos de fraccionamiento celular, se obtuvieron nuevas informaciones acerca de la localización intracelular de la acetilcolina y de otras sustancias activas en el cerebro. Actualmente se dispone de técnicas apropiadas para el aislamiento de fracciones puras de terminaciones nerviosas (fig. 24-18). Además, después de la ruptura del complejo formado por la terminación sináptica, se pueden aislar las vesículas sinápticas (fig. 24-19) y estudiar su contenido con métodos bioquímicos.

Es imposible resumir aquí todos los hallazgos concernientes a la localización de la acetilcolina y otros sistemas transmisores del sistema nervioso central.

El sistema de la acetilcolina consta de: a) el trasmisor representado por el éster de colina, la *acetilcolina*; b) la *colinacetilasa*, enzima implicada directamente en la síntesis, y c) la *colinesterasa*, enzima que hidroliza la acetilcolina una vez que ésta se ha liberado.

Los tres componentes del sistema de la acetilcolina se localizaron juntos en una fracción especial de las terminaciones nerviosas.

De acuerdo con la tabla 24-2, las terminaciones de los hemisferios cerebrales pueden separarse en dos grandes grupos, uno de los cuales, correspondiente a las subfracciones B y C es rico en aminas biógenas e incluye las *terminaciones nerviosas aminérgicas*. El otro grupo (subfracción D) es pobre en dichas aminas y contiene la descarboxilasa del ácido glutámico, enzima que sintetiza en forma irreversible el ácido γ -aminobutírico (GABA), uno de los principales transmisores inhibitorios en el cerebro. Se ha sugerido que las *terminaciones nerviosas no aminérgicas* son principalmente de naturaleza inhibitoria.⁵⁷

El aislamiento de las vesículas sinápticas (tabla 24-3) permitió demostrar que las distintas aminas biógenas se encuentran en ellas en elevada proporción y que son realmente los sitios de acumulación de los neurotransmisores. En las vesículas sinápticas se ha hallado acetilcolina, noradrenalina, dopamina e histamina, así como también 5-hidroxitriptamina.⁵⁸

TABLA 24-2. Distribución de las aminas biógenas y las enzimas del sistema del ácido γ -aminobutírico

<i>Estructura</i>	<i>Mielina (A)</i>	<i>Pequeñas terminaciones nerviosas (B)</i>	<i>Terminaciones nerviosas (C)</i>	<i>Terminaciones nerviosas (D)</i>	<i>Mitocondrias (E)</i>
Aminas biógenas					
Acetilcolina	0,15	2,24	2,99	0,94	0,58
5-Hidroxitriptamina . . .	0,61	0,78	2,17	0,76	0,48
Noradrenalina	0,32	2,05	1,66	0,77	0,72
Dopamina	0,79	1,85	1,13	0,91	0,71
Histamina	0,72	2,70	1,56	0,44	0,70
Enzimas					
Carboxilasa del ácido glutámico	0,02	0,49	1,22	2,00	0,40
γ -Aminobutírico-amino- transferasa	0,15	0,11	0,29	1,10	8,00
Deshidrogenasa succí- nica			0,52	2,10	7,60

(A-E) Subfracciones mitocondriales aisladas mediante centrifugación en un gradiente. Los resultados se expresan como concentraciones específicas relativas, que son los porcentajes de amina o enzima recuperada, divididos por el porcentaje de proteína recuperada. (Para bibliografía véase ⁵⁷.)

TABLA 24-3. Contenido de aminas biógenas en la subfracción M_1 , en las vesículas sinápticas (M_2) y en la fracción soluble (M_3)

Aminas biógenas	M_1	Fracción M_2	M_3
Acetilcolina	0,55	2,85	1,20
Noradrenalina	0,40	2,56	1,93
Dopamina	0,46	2,46	1,72
Histamina	0,39	2,24	2,27

La fracción mitocondrial cruda de cerebro fue sometida a shock osmótico y luego centrifugada. Los resultados se expresan en concentraciones específicas relativas, como se definió en la tabla 24-2. (Para bibliografía, véase ⁵⁷.)

Separación de las membranas de las terminaciones nerviosas y de los complejos de unión. Receptores centrales

Con el empleo de métodos de fraccionamiento celular es posible llevar a cabo una disección metódica de la terminación sináptica y sus membranas (fig. 24-20). Después del shock osmótico de la terminación nerviosa (B), todo su contenido desaparece, incluso las vesículas sinápticas, y quedan así las membranas aisladas (C).

Los tratamientos ulteriores de esas membranas con detergentes suaves dan lugar a la separación de los *complejos de unión* (D), que comprende las membranas sinápticas y las estructuras relacionadas.⁵⁹

Las membranas de las terminaciones nerviosas contienen importantes enzimas, como acetilcolinesterasa, ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dependiente,

p-nitrofenil-fosfatasa K^+ dependiente y adenil-ciclase.^{57, 60}

Esta última sintetiza el AMP 3'-5'-cíclico, que es considerado como un importante regulador de varias actividades celulares.⁶¹

Se ha encarado el problema de caracterizar y aislar los receptores químicos del cerebro, usando la capacidad de las membranas de ligar agentes bloqueadores colinérgicos, como la dimetil-d-tubocurarina y otros.⁶²

La propiedad de fijar esos agentes se localiza en las membranas de las terminaciones nerviosas, especialmente en los complejos de unión. De las membranas tratadas con dimetil- C^{14} -d-tubocurarina ⁶³ y serotonina- C^{14} se aisló un proteolípido ⁶⁴ que representa sólo una pequeña fracción de la proteína total de aquéllas. Se trata de una proteína soluble en solventes orgánicos, estrechamente ligada a las membranas sinápticas y que al parecer posee una localización subsináptica.⁶⁵ Este proteolípido es específico de las membranas de las terminaciones nerviosas y difiere, en su capacidad de fijar sustancias, de otros proteolípidos del sistema nervioso central, como el que se halla abundantemente en la mielina. En solución, es susceptible de experimentar cambios de forma bajo la acción de diferentes drogas que son activas en la transmisión sináptica.

En resumen: desde el punto de vista de la Biología celular, la transmisión del impulso nervioso representa otro ejemplo excelente de la relación íntima entre estructura y función. En la transmisión sináptica química, los conceptos de transmisores, flujos iónicos y poten-

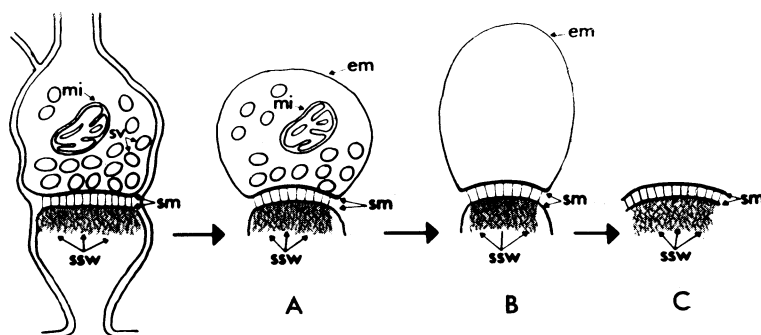


FIG. 24-20. Esquema de la disección sistemática de una terminación nerviosa del cerebro. Izquierda. Terminación de la corteza cerebral *in situ*. A Después del aislamiento. B Después del shock osmótico se observa la membrana de la terminación nerviosa. C Después del tratamiento con Triton X-100 queda el complejo de la unión sináptica; *mi*, mitocondria; *sm*, membrana sináptica; *ssw*, retículo subsináptico; *sv*, vesículas sinápticas; *em*, membrana de la terminación nerviosa. (De E. De Robertis, 1967.)

ciales sinápticos se correlacionan con los morfológicos de vesículas sinápticas, especializaciones de la membrana sináptica y proteínas receptoras. En realidad, en este proceso fundamental ocurre una serie de fenómenos bioquímicos, iónicos y eléctricos que se corresponden admirablemente con la organización macromolecular y química de la región sináptica.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- De Robertis, E.: (1964) *Histophysiology of synapses and neurosecretion*. Pergamon Press, Oxford.
- Eccles, J. C.: (1957) *The physiology of nerve cells*. Johns Hopkins Press, Baltimore.
- Eccles, J. C.: (1964) *The physiology of synapses*. Springer-Verlag, Berlin.
- Florey, E.: (1961) Trasmmitter substance. *Ann. Rev. Physiol.*, 23:501.
- Hodgkin, A. L.: (1958) Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibers. *Proc. roy. Soc. London*, ser. B, 148:1.
- Hydén, H.: (1960) The neuron. In: *The cell*, vol. 4, p. 215. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Katz, B.: (1961) How cells communicate. *Scient. Amer.*, 205 (Sept.):209.
- Katz, B.: (1966) *Nerve, muscle and synapse*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Loewenstein, W. R.: (1960) Biological transducers. *Scient. Amer.*, 203 (Aug.):99.
- Quarton, G. C. et al. (eds.): (1967) *The neurosciences*. The Rockefeller University Press, New York.
- Ruch, T. C. and Fulton, J. F.: (1960) *Medical physiology and biophysics*. 18th ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- Von Euler, V. S.: (1961) Neurotransmission in adrenergic nervous system. *Harvey Lect.*, ser. 55 (1959-1960):43.
12. *Neurosc. Res. Progr. Bull.*: (1968) 6, Nº 2.
13. Vial, J. D.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:551.
14. Zambrano, D. and De Robertis, E.: (1967) *Z. Zellforsch.*, 76:458.
15. Parker, G. H.: (1929) *Quart. Rev. Biol.*, 4:155.
16. De Robertis, E.: (1964) *Histophysiology of synapses and neurosecretion*. Pergamon Press, Oxford.
17. Pellegrino de Iraldi, A. and De Robertis, E.: (1968) *Z. Zellforsch.*
18. Davson, H.: (1959) *A textbook of general physiology*, 2nd ed. Little, Brown and Co., Boston.
19. Heilbrunn, L. V.: (1952) *An outline of general physiology*. 3rd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
20. Giese, A. C.: (1968) *Cell Physiology*. Saunders Co., Philadelphia.
21. Ruch, T. C. and Fulton, J. F.: (1960) *Medical Physiology and Biophysics*, Chap. 4. 18th ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
22. Hodgkin, A. L.: (1951) *Biol. Rev.*, 26:339.
23. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.: (1952) *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 17:43.
24. Tasaki, I.: (1953) *Nervous transmission*. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.
25. Davis, H.: (1961) *Physiol. Rev.*, 41:391.
26. Loewenstein, W. R.: (1960) *Scient. Amer.*, 2033 (Aug.):98.
27. Cajal, S. R.: (1934) *Trab. Inst. Invest. Biol.* (Madrid), 24:1.
28. Eccles, J. C.: (1957) *Physiology of nerve cells*. Johns Hopkins Press, Baltimore.
29. Arvanitaki, A.: (1942) *J. Neurophysiol.*, 5:108.
30. Furshpan, E. J. and Potter, D. D.: (1957) *Nature*, 180:342.
31. Ling, G. and Gerard, R. W.: (1949) *J. cell comp. Physiol.*, 34:383.
32. Fatt, P. and Katz, B.: (1950) *J. Physiol.*, 111:46.
33. Fatt, P. and Katz, B.: (1951) *J. Physiol.*, 115:320.
34. Nastuck, W. L.: (1950) *Fed. Proc.*, 9:94.
35. Nastuck, W. L.: (1953) *J. cell. comp. Physiol.*, 42:249.
36. Eccles, J. C.: (1964) *The physiology of synapses*. Springer-Verlag, Berlin.
37. Tauc, L. and Gerschenfeld, H. M.: (1960) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 257:3076.
38. De Robertis, E. and Bennett, H. S.: (1954) *Fed. Proc.*, 13:35.
39. De Robertis, E. and Bennett, H. S.: (1955) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:307.
40. De Robertis, E.: (1955) *Acta neurol. lat. amer.*, 1:1.
41. De Robertis, E.: (1955) *Anat., Rec.*, 121:284.
42. De Robertis, E.: (1958) *Exp. Cell Res.*, suppl. 5:347.
43. Palay S. L.: (1958) *Exp. Cell Res.*, suppl. 5, 275.
44. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. and Pellegrino de Iraldi, A.: (1962) *Nature*, 194:794.
45. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Salganicoff, L., Pellegrino de Iraldi, A. and Zieher, L. M.: (1963) *J. Neurochem.*, 10:225.
46. De Robertis, E.: (1959) *Int. Rev. Cytol.*, 8:61.
47. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. and Salganicoff, L.: (1961) *Anat. Rec.*, 139:220.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Weiss, P. and Hiscoe, H. B.: (1948) *J. exp. Zool.*, 107:315.
2. Droz, B. and Leblond, C. P.: (1962) *Science*, 137:1047.
3. Droz, B.: (1964) *Int. Cong. of Cell Biology. Excerpta med.*, 17A.
4. Taylor, A. C. and Weiss, P.: (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 54:1521.
5. Bear, R. S., Schmitt, F. O. and Young, J. Z.: (1937) *Proc. roy. Soc. London*, ser. B., 123:505.
6. De Robertis, E. and Franchi, C. M.: (1953) *J. exp. Med.*, 98:269.
7. Thornburg, W. and De Robertis, E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*
8. De Robertis, E. and Schmitt, F. O.: (1948) *J. cell comp. Physiol.*, 31:1.
9. Rodríguez Echandía, E. L., Riezzi, R. S. and Rodríguez, E. M.: (1968) *Amer. J. Anat.*, 122:157.
10. Wuerker, R. B. and Palay, S. L.: (1968) Cited in *Neurosc. Res. Progr. Bull.*, 6:125.
11. Kirkpatrick, J. B.: (1968) *Fed. Proc.*, 27:247.

48. De Lorenzo, A. J.: (1960) *Biol. Bull.*, 119:325.
49. Hama, K.: (1961) *Anat. Rec.*, 141:275.
50. Bennett, M. V. L., Aljure, E., Nakajima, Y. and Pappas, G. D.: (1963) *Science*, 141:262.
51. De Robertis, E. and Pellegrino de Iraldi, A.: (1961) *Anat. Rec.*, 139:298.
52. Pellegrino de Iraldi, A. and De Robertis, E.: (1963) *Int. J. Neuropharm.*, 2:231.
53. Birks, R. I., Huxley, H. E. and Katz, B.: (1960) *J. Physiol.*, 150:134.
54. Birks, R. I., Katz, B. and Miledi, R.: (1960) *J. Physiol.*, 150:145.
55. Fatt, P. and Katz, B.: (1952) *J. Physiol.*, 117:109.
56. Whittaker, V. P.: (1959) *Biochem. J.*, 72:694.
57. De Robertis, E.: (1967) *Science*, 156:907.
58. Maynert, E. W., Levi, R. and De Lorenzo, A. J.: (1964) *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 144:385.
59. De Robertis, E., Fiszer, S. and Azcurra, J. M.: (1967) *Brain Res.*,
60. De Robertis, E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., Alberici, M., Sutherland, E. W. and Butcher, R. W.: (1967) *J. Biol. Chem.*, 242:3487.
61. Sutherland, E. W., Oye, I. and Butcher, R. W.: (1965) *Recent Progr. Hormone Res.*, 21:632.
62. De Robertis, E., Azcurra, J. M. and Fiszer, S.: (1967) *Brain Res.*, 4:45 .
63. De Robertis, E., Fiszer, S. and Soto, E. F.: (1967) *Science*, 158:928.
64. Fiszer, S. and De Robertis, E.: (1969) *J. Neurochem.* (in press.).
65. De Robertis, E.: (1969) *J. Neurobiol.* 1:41.

Biología celular de la secreción

La *secreción* constituye una de las funciones más comunes de la célula. Puede definirse como el proceso en virtud del cual una célula sintetiza productos que serán luego utilizados por otras células o eliminados del organismo. En un individuo multicelular, la secreción es *externa* o *exocrina* cuando el producto elaborado se vierte en el medio externo o, más habitualmente, en cavidades naturales que comunican con el exterior (tubo digestivo, vías respiratorias), y es *interna* o *endocrina*, si aquél penetra en la circulación para actuar a distancia sobre otros tejidos. Esta última es característica de las glándulas endocrinas como la tiroides, paratiroides, hipófisis, suprarrenales e islotes de Langerhans del páncreas. Secreciones exocrinas típicas son las de los ácinos pancreáticos, glándulas salivales y pequeñas glándulas relacionadas con los tractos digestivo, respiratorio y genital.

En términos más generales, el concepto de secreción implica una *transformación química*. La célula absorbe pequeñas moléculas por procesos de transporte activo o pasivo, estudiados en el capítulo 21 a propósito de la permeabilidad celular.

Esas moléculas pueden ser concentradas o, con mayor frecuencia, transformadas en productos de estructura química y peso molecular diferentes. En ambos casos la célula debe utilizar energía para llevar a cabo las transformaciones químicas o el transporte de líquidos en contra de un gradiente de concentración. La secreción requiere trabajo y ello establece una diferencia definida con la simple *excreción* de sustancias no modificadas, que son expulsadas a favor de un gradiente de concentración sin que exista gasto de energía por parte de la célula. El paso del oxígeno a través del epitelio respiratorio y la filtración

de orina por el glomérulo del riñón son ejemplos de excreción. Sin embargo, los procesos de secreción y excreción coinciden frecuentemente y a menudo es difícil separarlos con claridad.

Una célula secretora puede ser comparada a una fábrica en la que *penetran* materias primas y de la que *salen* productos manufacturados. Entre estos dos extremos se encuentran todos los mecanismos intracelulares que conducen a la elaboración de un producto en particular. El proceso completo recuerda a la moderna “planta de montaje”, en la cual a medida que el producto pasa va siendo armado pieza por pieza.

De manera análoga, el producto de la secreción se constituye por el pasaje sucesivo de una estructura celular a otra.¹

La secreción es una función compleja en la que están comprendidos todas las partes y organoides descritos en los capítulos previos. El núcleo y el nucleólo, los ribosomas, el sistema vacuolar con el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, así como las mitocondrias, participan, de modo directo o indirecto, en la elaboración del producto final de secreción. El interés primordial en el estudio citológico de la secreción reside precisamente en el hecho de que existe una serie coordinada de fenómenos fisiológicos, en los que cada elemento de la maquinaria celular interviene en una etapa u otra del proceso. Ésta es una buena oportunidad para que el lector recuerde algunas de las funciones fundamentales estudiadas anteriormente, como:

a) La producción de diferentes moléculas de ARN por los genes estructurales y otros genes presentes en el ADN de los cromosomas; b) la participación del nucleólo en la biogénesis ribosómica; c) el significado del ribosoma, y en especial del polirribosoma,

como sitio donde tiene lugar la síntesis proteica, por medio de la interacción del ARN mensajero con el complejo formado por los aminoácidos y los diferentes ARN de transferencia; d) la función del retículo endoplásmico en el trasporte de proteínas fuera de la célula, y e) el papel del complejo de Golgi de concentrar los productos de secreción y proveerlos de una membrana envolvente.

También los lisosomas (véase cap. 21) se hallarían relacionados con el proceso de secreción, estimándose que en las células secretoras de prolactina de la hipófisis aquéllos regulan la cantidad de gránulos secretores. Dicha función sería llevada a cabo mediante la acción de citolisosomas o vacuolas autofágicas, con capacidad para digerir los gránulos.² Un mecanismo regulador similar se propuso para explicar los cambios cíclicos que ocurren en células neurosecretoras hipotalámicas.³ El estudio de la secreción es, por ende, una revisión de muchos capítulos de la Biología celular.

Los ejemplos de secreción celular que se proporcionarán estarán referidos en particular a los procesos destinados a la formación de proteínas. Esta actividad celular básica aparece tempranamente en la filogenia. Los espongiarios ya tienen células secretoras de mucus, así como otros tipos celulares que producen *espongina* (sustancia similar al colágeno). En los celenterados se encuentran típicas células productoras de mucus, y tanto en la gastrodermis de las hidras como en la epidermis de los ctenóforos, pueden hallarse células secretoras de proteínas. En la escala filogenética la actividad secretora se extiende luego a las células de los tejidos genitales y endocrinos, de manera que la secreción no sólo constituye una forma de adaptación al medio, sino que también interviene en la reproducción de las especies.⁴

CICLO SECRETOR

Métodos de estudio

De lo expresado hasta ahora, se deduce que en la secreción tiene lugar un cambio continuo, que puede interpretarse mejor estudiando a la célula en los diferentes estadios de su actividad.

Si se observan con el microscopio células secretoras fijadas y coloreadas, la imagen percibida es la representación de una sola etapa del trabajo celular. En la secreción celular, más que en cualquier otro proceso, hay que tener en cuenta el *factor tiempo* para evaluar los resultados obtenidos por el análisis citomorfológico. Existen células de *secreción continua* y otras en las cuales el proceso es *discontinuo*. En las primeras, el producto de secreción es eliminado tan pronto como se sintetiza; todas las etapas del proceso secretor (por ejemplo, absorción de materiales, síntesis intracelular y eliminación del producto)

se producen en forma simultánea y no se reconocen diferencias notables entre una célula y otra. Ejemplos de secreción continua se hallan en algunas glándulas endocrinas (tiroides, paratiroides y corteza suprarrenal) y en las células mucíparas del epitelio gástrico.

En la secreción discontinua el ciclo secretor posee una periodicidad especial, en la cual la absorción es seguida de la elaboración y ésta, a su vez, de la acumulación del producto. El tipo discontinuo de actividad se denomina también rítmico. En este caso hay considerables diferencias de una célula a otra, tanto en la morfología como en el metabolismo. Las células caliciformes del intestino y, en cierto grado, los ácinos pancreáticos son células secretoras rítmicas. La secreción se estudia mediante biomicroscopia (u observación vital), cuando puede realizarse por períodos de tiempo suficientemente prolongados. Sin embargo, no siempre es técnicamente posible y a menudo ofrece dificultades.

Aun en glándulas cuya actividad es continua, las diversas células pueden hallarse en etapas disímiles del ciclo secretor. Así, las glándulas salivales de la rata y del ratón poseen una actividad constante, a pesar de que los ácinos individuales evidencian una función rítmica. Por ello es necesario observar muchos cortes a distintos niveles de la glándula para poner de manifiesto los diferentes estadios.

En ciertas glándulas, a períodos de reposo casi completo suceden otros de intensa actividad. Para superar la dificultad de sorprender simultáneamente las diversas fases del ciclo secretor, puede recurrirse a estímulos especiales que modifican bruscamente la actividad secretora de las células, tratando de inducir en ellas un sincronismo funcional. Si, por ejemplo, se desea estudiar la secreción de las células pancreáticas exocrinas, primero se somete al animal a un período de ayuno, para conseguir un estado de reposo glandular, y después se estimulan las células proporcionando alimento a los animales o por medio de la *pilocarpina*, cuya acción provoca la rápida salida del producto de secreción. De esta manera, las distintas fases de la actividad celular se sincronizan y prácticamente todas las células expulsan su contenido, que luego recuperarán en forma gradual (fig. 25-1). En algunos casos, como en la glándula submaxilar de la rata, las diferencias sexuales, que están bajo el control hormonal, son ven-

tajosas para el estudio citológico y citoquímico de la secreción.⁵

El examen citológico se realiza en tiempos variables después de aplicado el estímulo, y puede ser puramente cualitativo o bien cuantitativo, utilizando el método estadístico.⁶ En este último se trata de descubrir un estadio celular cualquiera (por ejemplo, mitosis) y se cuentan las células presentes, para calcular su densidad en función del tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo.

Actualmente, los métodos para el estudio de la biología de la secreción son múltiples y comprenden, no sólo el examen de células secretoras vivientes por largos períodos de tiempo o a intervalos variables después de la fijación, sino también el empleo de métodos de fraccionamiento para separar diferentes partes de la célula secretora, la canulación o fistulización de los conductos excretores de las glándulas con el objeto de analizar los productos que son eliminados después de la aplicación del estímulo, y especialmente el uso de precursores radiactivos de los compuestos elaborados. Esta técnica, cuando se emplea para la observación de autorradiografías con el microscopio óptico o electrónico,

suministra información valiosa acerca de la dinámica del proceso secretor en relación con la estructura celular.

La fijación mediante el método de congelación-deseccación (véase cap. 7) es apropiada en el estudio del ciclo secretor, ya que detiene los procesos celulares rápidamente y permite determinar así sus diferentes estadios. Además, se visualizan en mejores condiciones y sin cambios las sustancias solubles y las secreciones proteicas cuando se encuentran en diluciones elevadas. En el caso de la tiroides, este método demuestra un coloide intracelular que no se aprecia fácilmente con otros procedimientos y hace posible seguir las diferentes etapas de su formación y excreción. Así, si un animal es inyectado con hormona tirotrópica, al cabo de pocos minutos aparecen muchas gotas de coloide en el polo apical de la célula, que luego son excretadas en el interior del folículo tiroideo. La salida de las gotas se realiza por la evaginación del citoplasma y la ruptura de la membrana celular en ciertos puntos. Después de esta primera etapa de excreción apical, comienza la resorción del coloide folicular, que pasa a través

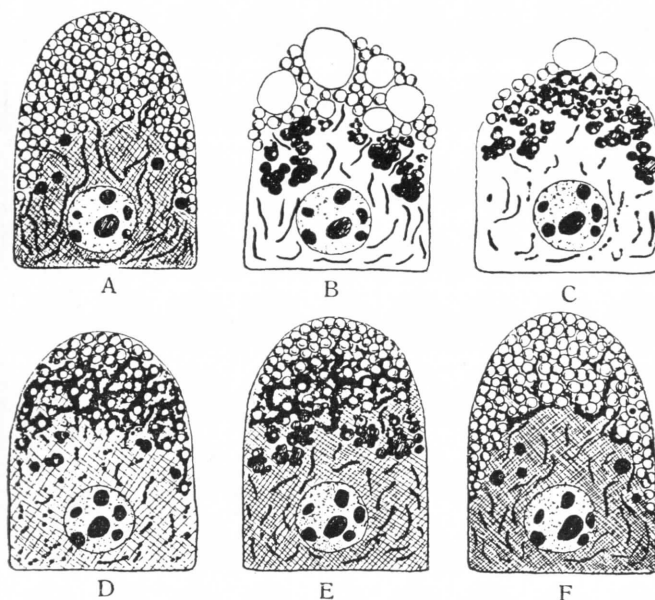


FIG. 25-1. Ciclo secretor de la célula pancreática del ratón blanco. *A* Célula de un animal en ayuno: gránulos de cimógeno y mitocondrias; sustancia basófila abundante. *B* Media hora después de inyectar pilocarpina: vacuolización y excreción del cimógeno; hipertrofia del aparato de Golgi; desaparición de la sustancia basófila. *C* Una hora después: excreción casi total; acentuada osmiofilia del complejo de Golgi. *D* Cuatro horas después: red de Golgi típica con gránulos neoformados. *E* Siete horas después: continúa el proceso de restitución. *F* Catorce horas después: restitución terminada. (De Ries.)

de la célula en dirección de los capilares sanguíneos (De Robertis, 1949).

Algunos aspectos citológicos del ciclo secretor

El ciclo secretor se manifiesta a nivel citológico de manera variable, pero en general está caracterizado por la aparición de productos visibles con el microscopio, que se acumulan en las células y después son eliminados. Se trata de gránulos densos y refringentes, de vacuolas, gotas, etcétera, que tienen una posición definida en la célula y que a veces presentan reacciones histoquímicas características.

En algunas glándulas no es posible establecer con métodos citológicos comunes ningún producto de secreción, aun cuando los estudios fisiológicos indican que la secreción es activa. Un ejemplo típico es el de la paratiroides, cuya potente hormona regula el metabolismo del calcio. Vistas con el microscopio óptico, sus células no revelan producto alguno que pueda considerarse como una presecreción o un precursor intracelular de la secreción.

La existencia de un ciclo secretor se corrobora en este caso por las modificaciones que tienen lugar en el núcleo y en los componentes citoplásmicos, cuando es alterada la actividad normal de la glándula. Por ejemplo, la inyección de una sola dosis elevada de extracto paratiroideo, suscita una disminución de la actividad funcional de la paratiroides, seguida de una lenta recuperación. Sometiendo los animales a dietas raquitógenas, se produce hiperactividad celular. Por medio de estas experiencias puede deducirse aproximadamente cuál es el ciclo citomorfológico normal de la secreción, aunque el producto elaborado no sea visible.^{7, 8}

Morfología submicroscópica de la secreción en la médula suprarrenal

La introducción del microscopio electrónico ha permitido aclarar la relación entre la ultraestructura del citoplasma y los productos de secreción.

El estudio detallado de la morfología submicroscópica de la secreción⁹ escapa al objetivo de este libro, por lo cual consideraremos aquí sólo dos ejemplos en los cuales se ha evidenciado la correlación morfológica-funcional

mediante el empleo de técnicas para el estudio de la ultraestructura y la citoquímica.

Un material particularmente favorable para analizar el proceso secretor es el de las células de la médula suprarrenal, que elaboran catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Como Plenick demostró en 1902, las catecolaminas reducen intensamente el tetróxido de osmio y con dicha reacción es posible identificar minúsculas cantidades intracelulares (fig. 25-2).

Las primeras gotas de secreción aparecen en las zonas más profundas del citoplasma, cerca de la membrana nuclear (fig. 25-3, A y B). Algunas de las pequeñas vesículas que pertenecen al complejo de Golgi se llenan de un material denso correspondiente a las catecolaminas. Estas gotitas, siempre rodeadas de una membrana, emigran hacia la superficie de la célula al mismo tiempo que aumentan de tamaño y densidad. Como resultado de ese proceso de elaboración, el citoplasma se presenta colmado de gotas densas que alcanzan un diámetro de unos 160 mμ (figura 25-2).

La expulsión del material secretor está regida por la estimulación de los nervios espláncnicos, cuyas terminaciones se hallan ocupadas por vesículas sinápticas (véase cap. 24). Estas terminaciones son colinérgicas, lo cual significa que la estimulación del nervio libera acetilcolina y, de ese modo, es activada la excreción de catecolaminas. La estimulación eléctrica, que induce la máxima expulsión de la secreción, también aumenta el número de vesículas en la terminación y la cantidad de la acetilcolina liberada.¹⁰

Desde el punto de vista morfológico, es de considerable interés el mecanismo por el cual el producto de secreción pasa a los espacios intercelulares. Como se indica en el esquema de la figura 25-3, las gotitas que contienen las catecolaminas se adhieren a la superficie de la membrana; luego aumentan de tamaño y pierden densidad (hinchamiento) y, por último, el material denso sale dejando membranas vacías que probablemente se incorporan a la membrana externa. Al mismo tiempo, se forman activamente nuevas gotas en la zona del complejo de Golgi¹¹ (fig. 25-3).

Con anterioridad se había considerado un mecanismo similar para la salida del contenido de las vesículas sinápticas en las terminaciones nerviosas.¹² Conforme a ello, la acetilcolina, adrenalina, noradrenalina y otros agentes humorales activos pueden ser *sinte-*

tizados por la célula, acumulados dentro de una membrana y transportados hacia la membrana superficial donde son liberados instantáneamente, apenas entran en acción los estímulos pertinentes.

En la liberación de las catecolaminas tiene importancia el ión Ca^{++} , ya que sólo ocurre en presencia de éste.¹³ Es posible que la liberación de acetilcolina a nivel de las terminaciones nerviosas provoque la entrada de Ca^{++} en las células suprarrenales y éste, a su vez, la de agua dentro de los gránulos secretores,

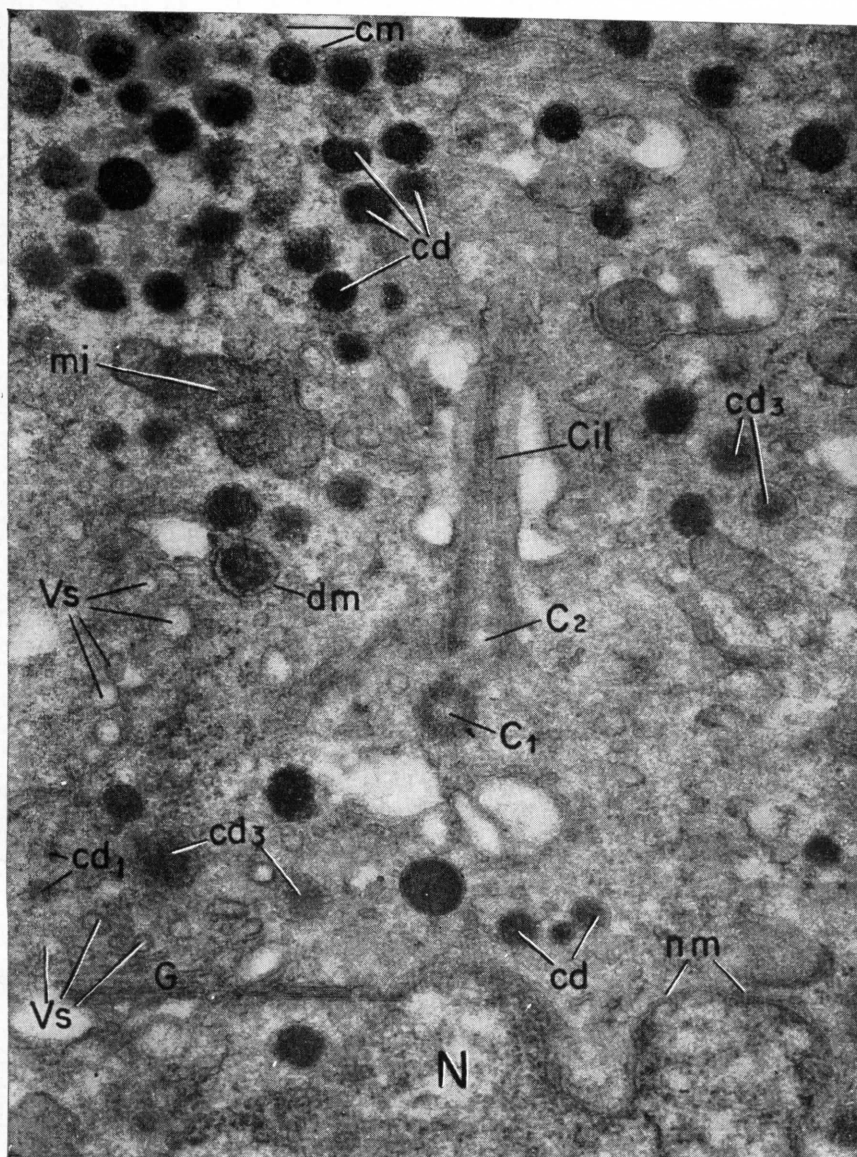


FIG. 25-2. Fotomicrografía electrónica de una célula cromafín de la glándula suprarrenal del hámster. Al pie se puede ver el núcleo (N) con la membrana nuclear plegada (nm). La porción supranuclear del citoplasma muestra el complejo de Golgi (G), dos centriolos (C_1 , C_2) con un cilio (Cil) formándose en uno de ellos, varias mitocondrias (mi) y las gotas que contienen catecolamina (cd). Las gotas más pequeñas (cd_1 , cd_3) aparecen en la zona de Golgi. Dentro de algunas de las vesículas de Golgi pequeñas (Vs) se observa la primera aparición de un depósito denso. A medida que las vesículas aumentan de tamaño y el contenido es mayor, el espacio claro debajo de la membrana de la gota (dm) se estrecha. Gotas de catecolamina completamente formadas (cd) ocupan la parte periférica del citoplasma, cerca de la membrana celular. 51,500 $\times$. (De E. De Robertis y Sabatini.)

que se hidratan y adhieren posteriormente a la membrana plasmática.

Exocitosis y secreción de catecolaminas en la glándula suprarrenal. El mecanismo de exocitosis propuesto para la secreción de catecolaminas por la médula suprarrenal^{10, 11} fue confirmado mediante estudios bioquímicos. Dicho mecanismo implica que todos los componentes del gránulo que contiene a las catecolaminas (gránulo cromafín) se liberarían al mismo tiempo.

Recientemente, se aislaron gránulos cromafines por centrifugación en gradiente,¹⁴ obteniéndoselos con un alto grado de pureza.¹⁵ Su composición (en porcentaje de peso seco) es la siguiente:

Proteínas	35,0
Lípidos	22,0
Catecolaminas	20,5
ATP	15,0

La mayor parte de los lípidos, especialmente los fosfolípidos y el colesterol, se encuentran en la membrana y pueden separarse lisando los gránulos en soluciones hipotónicas. La membrana contiene también algunas proteínas insolubles y enzimas ligadas a membranas, particularmente ATPasa, dopamina β -hidroxi-

lasa y un citocromo especial (b-559). Dentro del gránulo existen varias proteínas solubles, denominadas cromograninas.¹⁶ Se supone que las aminas forman un complejo con el ATP y las proteínas,¹⁷ y que por cada molécula de cromogranina hay alrededor de 385 de aminas y 95 de ATP.

Las primeras evidencias bioquímicas en apoyo del mecanismo de exocitosis provinieron de observaciones en las que el afluyente venoso de la glándula suprarrenal poseía, después de la estimulación, nucleótidos de adenina en el mismo cociente molar que las catecolaminas, como sucede en los gránulos aislados.^{18, 19} El hallazgo de las proteínas solubles del gránulo en la sangre venosa suministró pruebas más directas. La estimulación de la glándula perfundida permite obtener las diferentes cromograninas que se hallan en los gránulos cromafines,²⁰ según se advierte en la figura 25-4. Cuantitativamente pudo demostrarse que por la acción de estímulos se liberan, junto con las catecolaminas, todo el ATP y las cromograninas contenidas en el gránulo, mientras que los lípidos ligados a las membranas, al igual que las enzimas, permanecen prácticamente en el tejido. Estas comprobaciones confirman el mecanismo de exocitosis propuesto originalmente por De Robertis y Vaz Ferreyra, sobre la base de observaciones con el microscopio electrónico.¹⁰

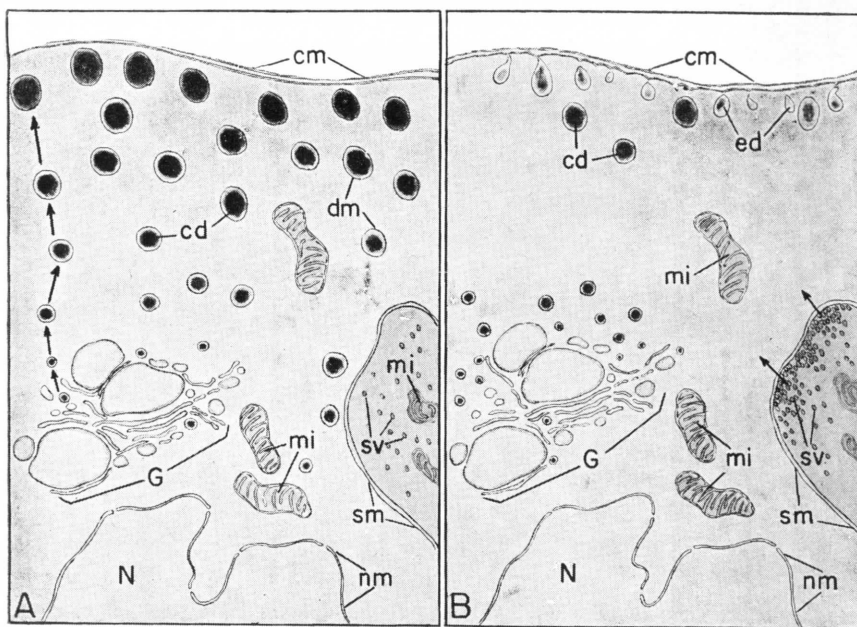


FIG. 25-3. Interpretación esquemática del mecanismo de la secreción en la célula cromafín. A Célula en reposo en la cual las gotas de catecolamina se han acumulado en el citoplasma externo. Cerca del núcleo, dentro del complejo de Golgi, una nueva secreción se va formando lentamente. A la derecha, porción de la terminación nerviosa con vesículas sinápticas (sv) y mitocondrias (mi). cm Membrana celular; cd, gotas de catecolamina; dm, membranas de las gotas; G, complejo de Golgi; N, núcleo; nm, membrana nuclear; sm, membrana sináptica. B Célula cromafín después de una fuerte estimulación eléctrica del nervio esplácnico. Las gotas de catecolamina han desaparecido y las pocas que quedan se ven en diferentes estados de su excreción en el espacio intercelular. La región de Golgi forma nuevas gotas rápidamente. En la terminación nerviosa se evidencia un aumento de las vesículas sinápticas con acumulación de los "puntos activos" sobre la membrana sináptica. (De E. De Robertis y Sabatini.)

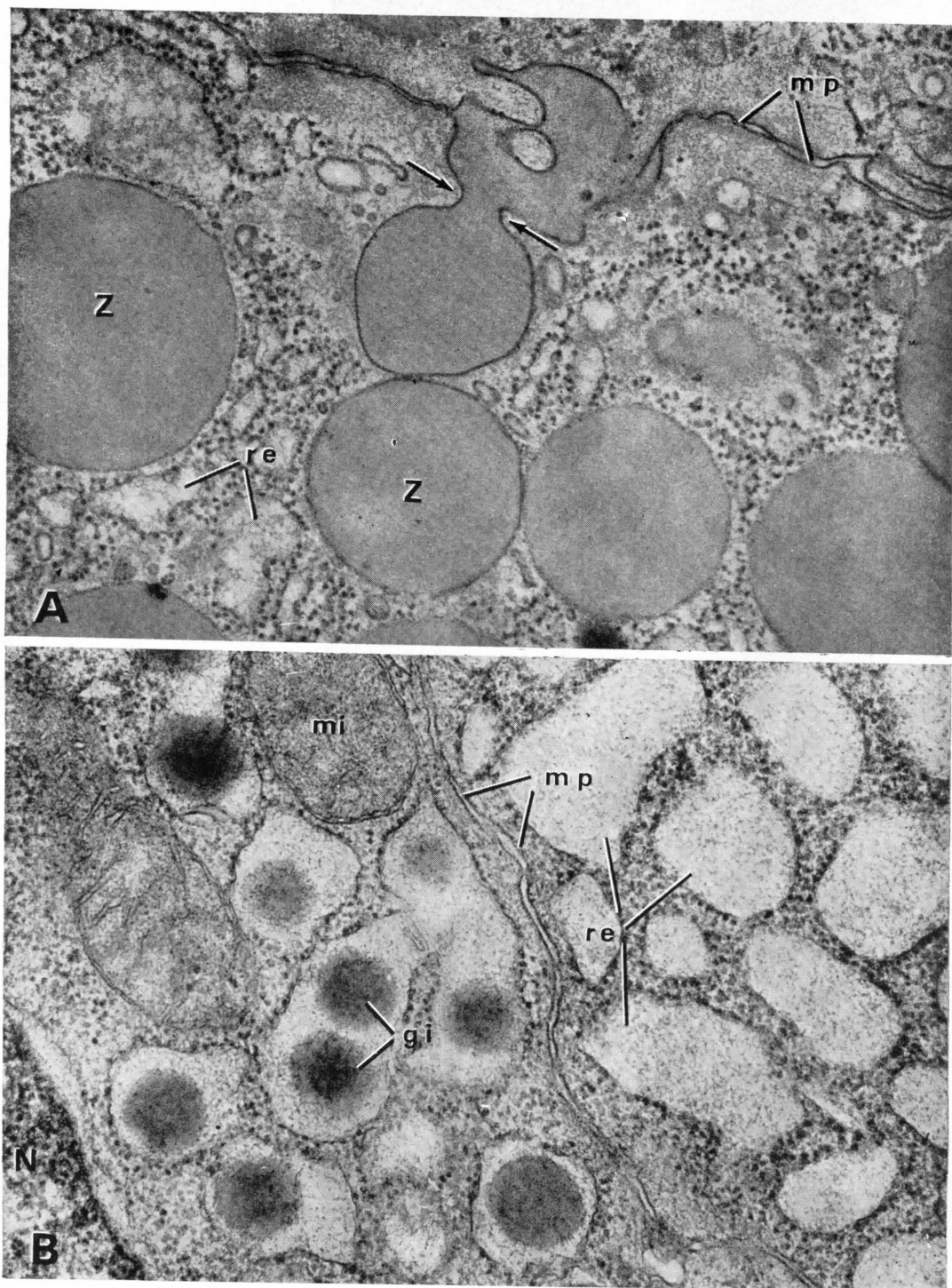


FIG. 25-5. A Región apical de una célula pancreática de cobayo en la que se advierten los gránulos de zimógeno (Z), uno de los cuales se halla en el proceso de expulsión por exocitosis. re Reticulo endoplásmico; mp, membrana plasmática. (Cortesía de G. E. Palade.) B Región basal de la misma célula mostrando cisternas del RE ensanchadas. Algunas de ellas contienen gránulos intracisternales (gi). mi Mitocondria; N, núcleo. 30,000 $\times$. (Cortesía de D. Zambrano.)

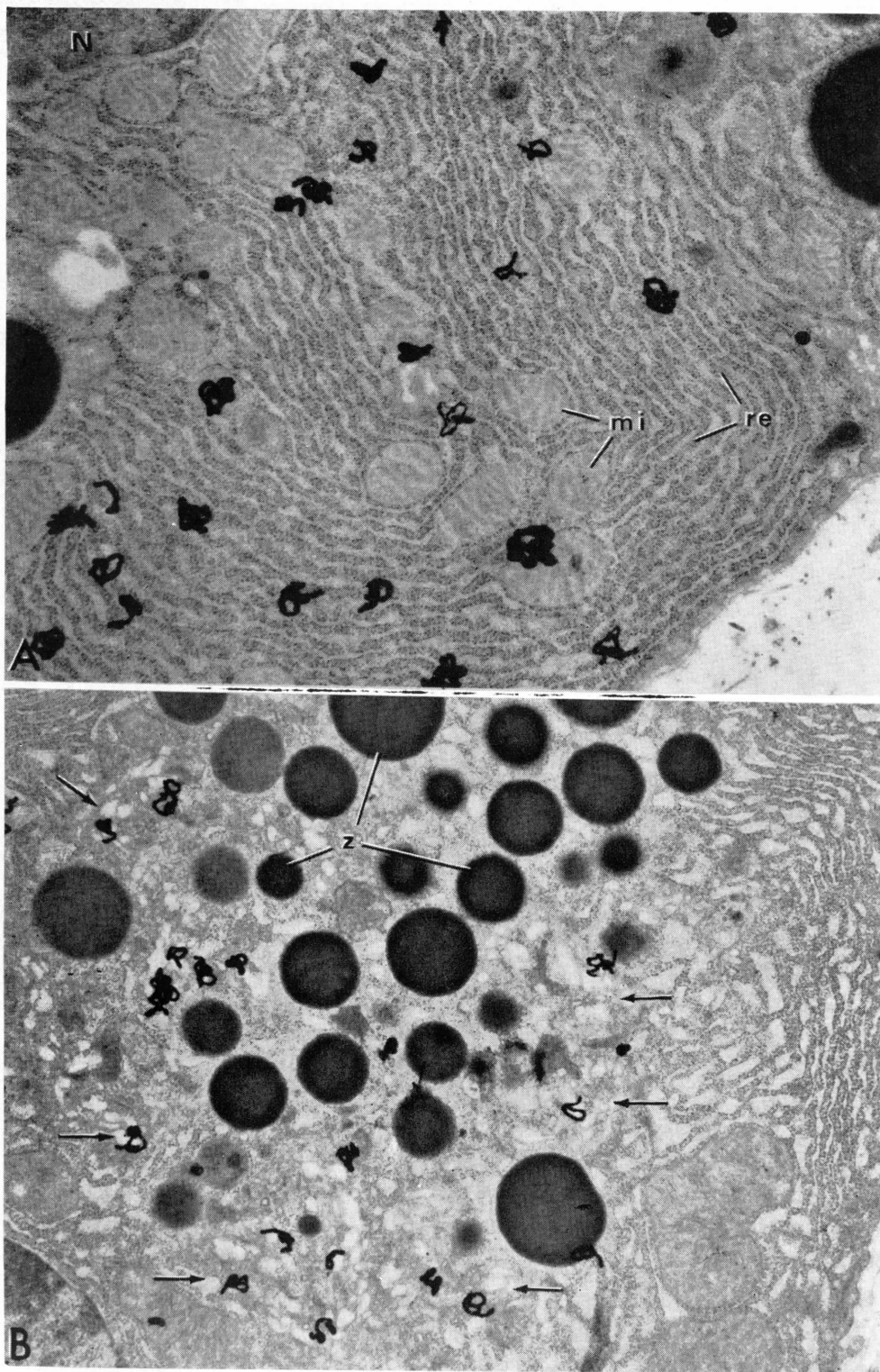


FIG. 25-6. Fotomicrografías electrónicas de una radioautografía de células pancreáticas del cobayo. A Tres minutos después del marcado con leucina $-H^3$. Los granos fotográficos se hallan exclusivamente en el retículo granular (*re*); *mi*, mitocondria; *N*, núcleo. 17,000 $\times$. B Siete minutos después. La radiactividad se encuentra ahora en la región del complejo de Golgi (*flechas*). 17,000 $\times$. (Cortesía de J. D. Jamieson y G. E. Palade.)

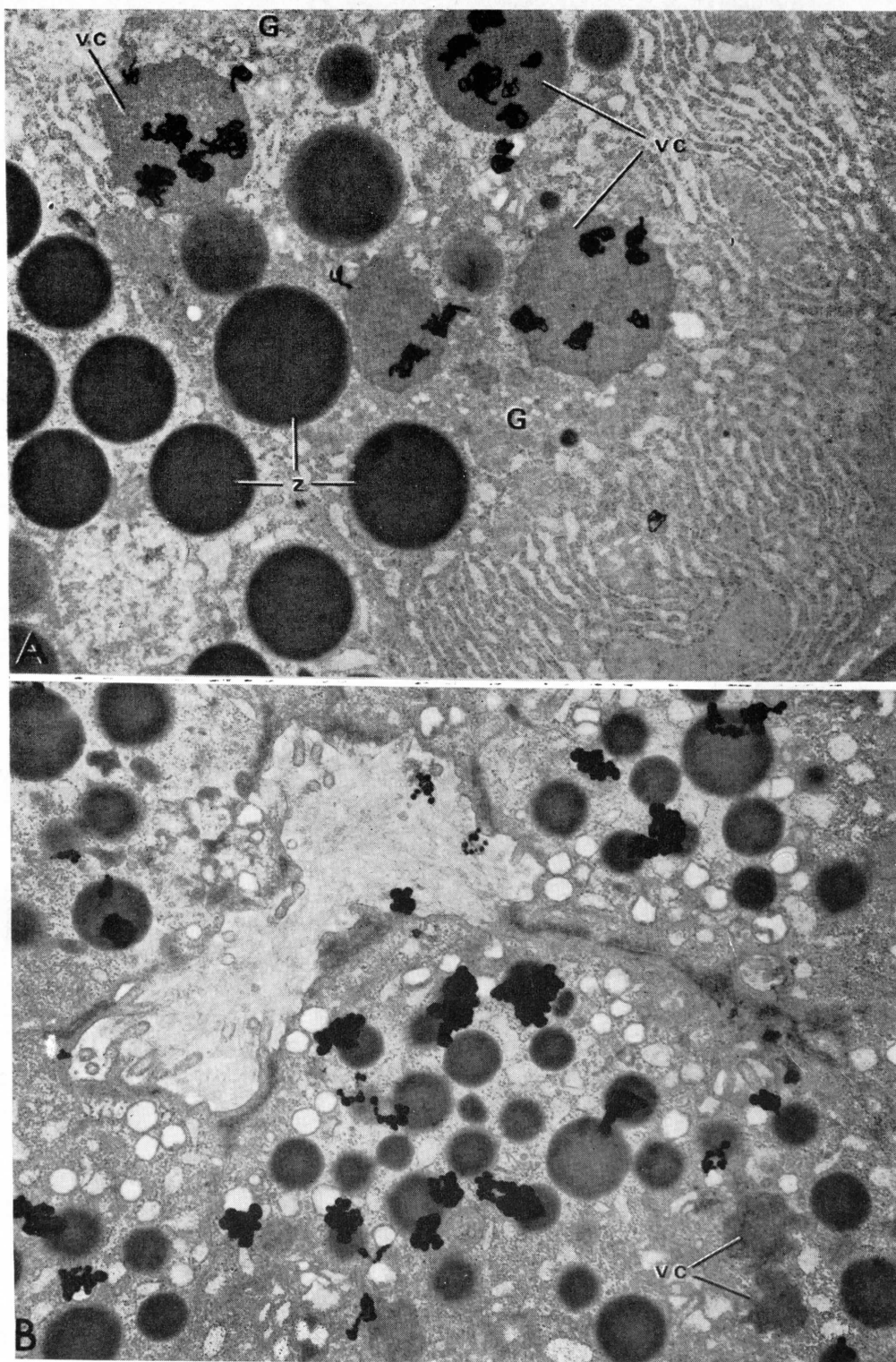


FIG. 25-7. A Lo mismo que en la figura 25-6, pero 37 minutos después del marcado con leucina- H^3 . Los granos se hallan en las vacuolas condensantes (vc) del complejo de Golgi (G). Los gránulos de zimógeno no se marcan (z). 13,000 $\times$. B Lo mismo, 117 minutos después. Los granos fotográficos se localizan en los gránulos de zimógeno. Algunos gránulos se hallan en la luz del ácino, 13,000 $\times$. (Cortesía de J. D. Jamieson y G. E. Palade.)

nógeno B, procarboxipeptidasa B, desoxirribonucleasa y procarboxipeptidasa A.

La identidad en la composición enzimática entre los gránulos de cimógeno y el jugo pancreático obtenido por canulación del conducto excretor, proporciona una prueba más positiva de que los gránulos representan los productos de secreción.²²

Ultraestructura de la secreción pancreática

El estudio del proceso de secreción del páncreas mediante microscopía electrónica confirmó la existencia de una relación funcional entre el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi. El material sintetizado por los ribosomas se observa a veces dentro de las cavidades del RE, formando los denominados *gránulos intracisternales*.^{24, 25} (figura 25-5, B). Este material pasa en seguida al complejo de Golgi y finalmente se concentra y acumula en los gránulos de cimógeno. El empleo de aminoácidos radiactivos, como la leucina marcada con tritio (leucina -H³), ha convalidado la secuencia estructural: RE → Golgi → gránulos de cimógeno, y el tiempo que ésta incluye.

Si se mantienen cobayos en ayuno durante varias horas y luego se les inyecta leucina -H³ por vía endovenosa, es posible observar en las autorradiografías vistas con el microscopio

electrónico que, pocos minutos después de la inyección, el isótopo se localiza en el retículo endoplásmico de la región basal. En un segundo tiempo, la proteína sintetizada pasa al complejo de Golgi, donde se concentra progresivamente en gránulos de procimógeno, o vacuolas condensantes, rodeados de una membrana. Si el animal es sacrificado al cabo de un período de tiempo más largo, la proteína marcada se encuentra principalmente en los gránulos de cimógeno y en la luz de los ácinos.²⁶

Las figuras 25-6 y 25-7 ilustran las secuencias que tienen lugar en cortes delgados de páncreas marcados mediante un pulso de leucina-H³, seguido de radioautografía al nivel del microscopio electrónico en lapsos variables después del marcado.^{28, 29}

La liberación de los gránulos de cimógeno se produce por la fusión de sus membranas limitantes con la membrana celular, en la superficie de la luz glandular,²⁷ proceso actualmente denominado *exocitosis* (fig. 25-5, A).

Secuencia de los procesos de secreción intracelular

El estudio de la síntesis y migración de las proteínas en el páncreas de rata ha proporcionado resultados similares. Debido a los hábitos alimentarios de estos roedores, la síntesis y secreción del páncreas se realizan en forma continua. Después de la inyección de un precursor, se determinó la concentración radiactiva (expresada por el número de gránulos de

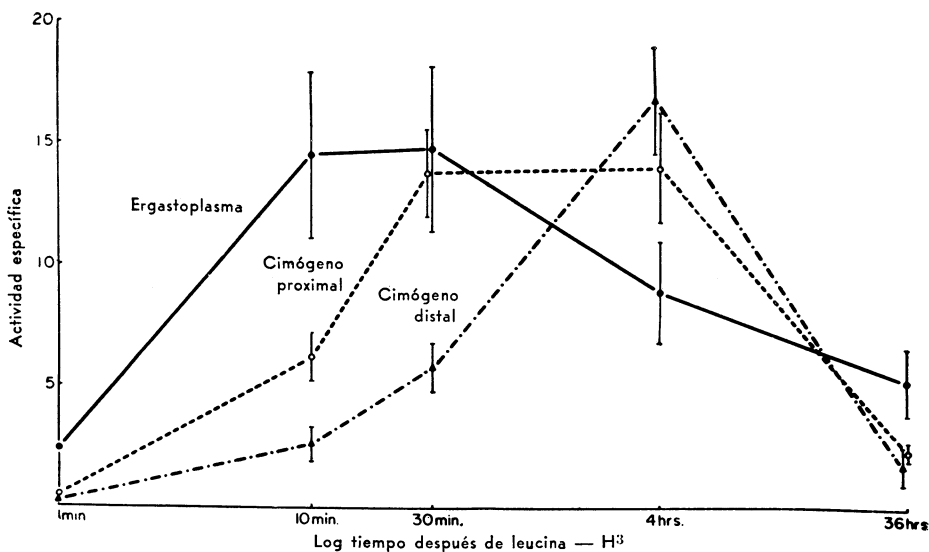


FIG. 25-8. Esquema de la actividad específica de las proteínas en el ergastoplasma en función del logaritmo del tiempo, después de la inyección de leucina-H³ en ratas. El máximo de la actividad específica se produce primero en el ergastoplasma, luego en la región proximal del cimógeno y finalmente en la región distal. (De Warschawsky y col., 1963.)

plata por unidad de área en la autorradiografía observada con el microscopio óptico) y la concentración de proteína.³⁰

Como se ve en la figura 25-8, la radiactividad aumenta rápidamente en la zona basal, que contiene el retículo endoplásmico o ergastoplasma, y en ella aparece proteína marcada con leucina -H³ al cabo de 2 a 5 minutos. Su concentración se eleva hasta los 30 minutos, pero luego decrece. Determinaciones análogas se efectuaron en otras dos regiones del ácino pancreático: la zona proximal de los gránulos de cimógeno, donde se halla también el aparato de Golgi, y la porción distal del cimógeno, cercana a la luz (figura 25-8).

La velocidad de recambio (*turnover*) de la radiactividad en las tres regiones de la célula se calculó en 4.7 minutos para la síntesis en el ergastoplasma basal, 11.7 minutos en el Golgi-cimógeno proximal y 36 minutos en la región del cimógeno distal. La suma de estas dos últimas cifras (es decir, 47.7 minutos) representa el lapso de vida media de un gránulo de cimógeno en la célula acinosa de la rata. Sumando todos los tiempos se obtiene el lapso de vida total de las proteínas producidas hasta su expulsión; éste es de 52.4 minutos.

Además de las proteínas "de expulsión", con un rápido *turnover*, el ergastoplasma aparentemente sintetiza otras proteínas de mucho menor velocidad de recambio (término medio de 62.5 horas) que permanecen en la célula y no son expulsadas; se las denomina *proteínas sedentarias*.

Papel del complejo de Golgi en el transporte intracelular

El papel del complejo de Golgi en la secreción pancreática fue determinado recientemente en cortes de tejido incubados con leucina -C¹⁴ durante sólo 3 minutos, seguido de un lavado y de su incubación posterior en leucina fría (no marcada). Los fraccionamientos celulares llevados a cabo en períodos variables permiten hacer un análisis ci-

nético del transporte proteico. Esos estudios confirmaron que la primera síntesis de proteínas secretoras tiene lugar en el retículo endoplásmico granular. A los tres minutos de incubación la fracción de microsomas granulares (con ribosomas adheridos) contiene más del doble de la radiactividad que la fracción agranular, fundamentalmente representada por las vesículas del Golgi. Como demuestra la figura 25-9, a los siete minutos la situación se invierte completamente y la radiactividad específica en las vesículas del Golgi llega a su máximo nivel. Este hallazgo proporcionó evidencias directas del transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi, por medio de las pequeñas vesículas que rodean a este último.²⁸

Con experimentos similares, en los cuales se aislaron los gránulos de cimógeno, fue analizada la función de las vacuolas condensantes durante la secreción. Esa fracción contiene una pequeña cantidad de vacuolas condensantes que pueden reconocerse morfológicamente. La observación con el microscopio electrónico de radioautografías realizadas con leucina -H³, demostró que las vesículas poseían intensa radiactividad entre 17 y 57 minutos después, lapso en el cual los gránulos de cimógeno presentan poco o ningún marcado radiactivo. Ello está de acuerdo con la presunción de que las proteínas son transportadas desde las pequeñas vesículas del Golgi a las grandes vacuolas condensantes, donde son concentradas de manera progresiva, posiblemente por bombas de iones intracelulares que reducen el contenido de agua de la secreción incluida en los gránulos de cimógeno.²⁹

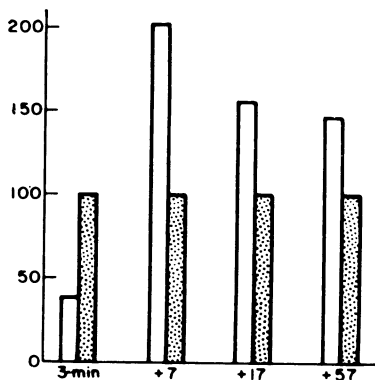


FIG. 25-9. Radiactividad específica en el Golgi (barras claras) y en los microsomas (barras punteadas), a intervalos variables después del marcado con leucina-H³ e incubación posterior en leucina fría. (Correspondencia de J. D. Jamieson y G. E. Palade.)

Requerimientos metabólicos para el transporte y excreción

Las diversas etapas del proceso secretor y la descarga de gránulos de cimógeno tienen diferentes necesidades energéticas. El transporte de la cadena polipeptídica sintetizada por el ribosoma a las cisternas del retículo endoplásmico³¹ no requiere energía adicional³² y parece ser controlado fundamentalmente por la relación estructural que existe entre la subunidad ribosómica mayor y la membrana del retículo^{33, 34} (véase cap. 19). Cuando el proceso de síntesis proteica es inhibido por la puomicina, se verifica el transporte de los péptidos sintetizados incompletamente, tanto en el páncreas³³ como en las células neurosecretoras.³⁵ Un estudio análogo realizado con otro inhibidor de la síntesis proteica, la cicloheximida, también puso de manifiesto que el transporte intracelular no depende de la síntesis de proteínas secretadas, pudiendo continuar aun en su ausencia.³⁶

El transporte desde el retículo endoplásmico a la

vacuola condensante no se halla afectado por los inhibidores de la glucólisis (fluoruros, yodoacetatos), pero en cambio es bloqueado con inhibidores de la respiración celular (N_2 , cianuro, antimicina A) o de la fosforilación oxidativa (dinitrofenol, oligomicina). Una conclusión importante de estos estudios es que

existe una especie de *válvula dependiente de energía* en el transporte de elementos entre el retículo endoplásmico y las pequeñas vesículas del Golgi, ubicada en la periferia de este último. La válvula regularía el flujo de las proteínas secretoras, mecanismo que podría ser retardado por los inhibidores metabóli-

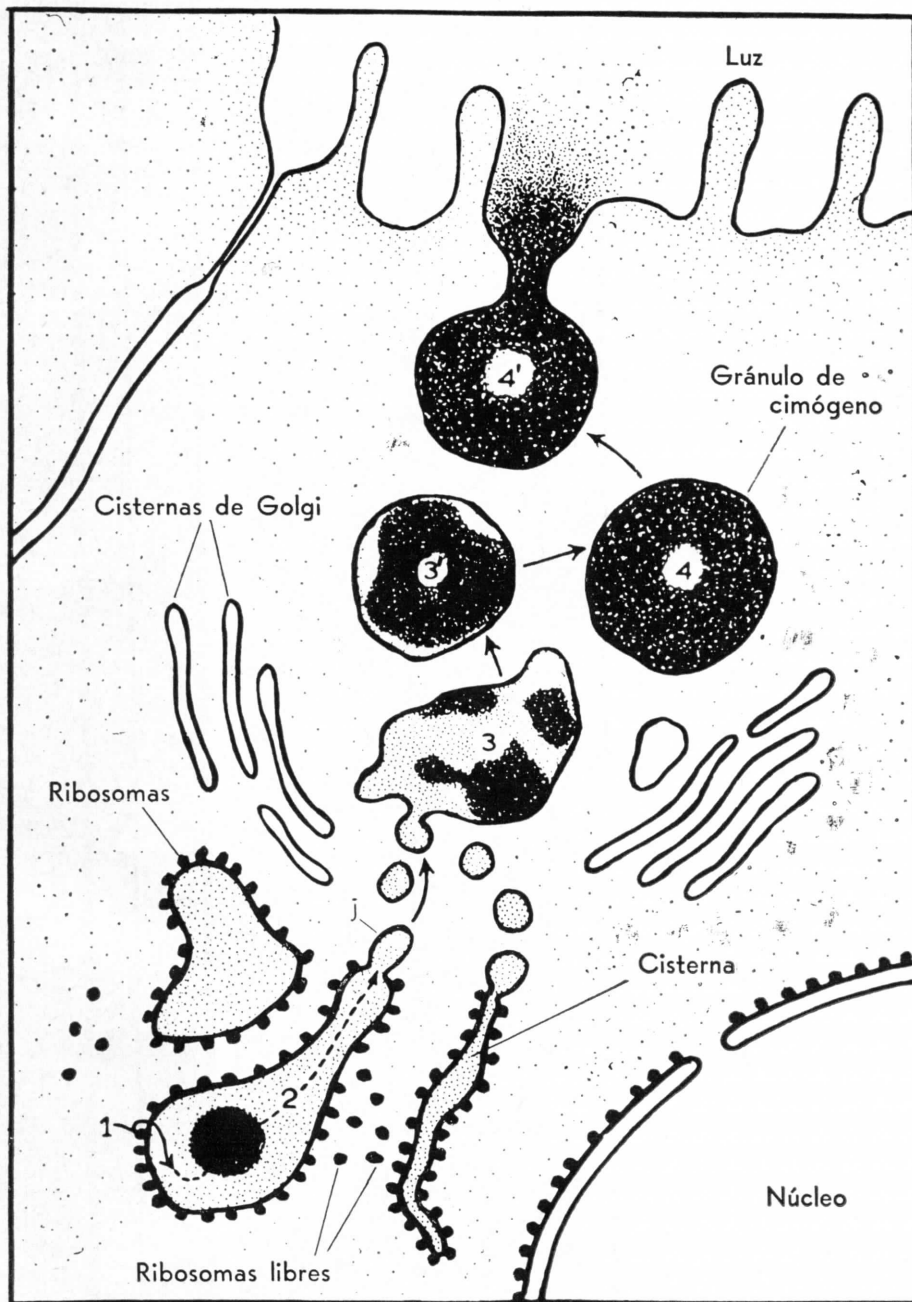


FIG. 25-10. Esquema del proceso secretor, en el ácino pancreático, con los diferentes estadios descritos en el texto. 1 Estadio ribosómico; 2, estadio en el retículo endoplásmico; 3, 3', estadio en el complejo de Golgi; 4, estadio en el gránulo de zimógeno; 4', pasaje del zimógeno a la luz del ácino. (Cortesía de George E. Palade.)

cos.³⁷ En el esquema de la figura 25-9, la válvula estaría situada en algún lugar de la región indicada por la flecha, entre *J* y la vacuola condensante. La etapa final de la secreción, que comprende la exocitosis, también requiere energía derivada de la respiración celular.³⁸ Si bien los inhibidores de la síntesis proteica o de la glucólisis no interfieren en la descarga, ésta es abolida por inhibidores respiratorios como la antimicina. Se supone que la energía está relacionada con el proceso de fusión de membranas entre el gránulo de cimógeno y la membrana plasmática, que tiene lugar durante la descarga del cimógeno.³⁹

Mecanismo de síntesis proteica y de secreción en el páncreas

Ahora es posible resumir todos los datos disponibles en una teoría coherente acerca de la secreción proteica del páncreas, que probablemente sea aplicable a otras células secretoras de proteínas. Se reconoce la siguiente secuencia en las etapas de secreción (fig. 25-10):

a) *Etapla ribosómica*. Las proteínas son sintetizadas en contacto directo con los polirribosomas presentes en la superficie del sistema vacuolar del retículo endoplásmico. Como se indicó en el capítulo 19, la síntesis es llevada a cabo por la interacción del ARN mensajero, que trasporta la información genética desde la molécula de ADN contenida en el cromosoma, con el complejo aminoacil-ARN de transferencia, que coloca a los aminoácidos en la secuencia apropiada para su polimerización ulterior en la molécula proteica. Esta primera etapa tiene lugar en cuestión de segundos o de minutos.

Es posible que la disposición de los ribosomas sobre las membranas, con la adherencia de la subunidad 60 S, facilite la interacción con el ARN mensajero y también el rápido pasaje vectorial de la proteína al sistema del retículo endoplásmico.

b) *Etapla del retículo endoplásmico*. La proteína sintetizada (por ejemplo, enzimas) penetra en seguida en las cisternas del retículo endoplásmico y emigra hacia la zona apical de la célula. A veces este material se presenta como pequeños gránulos intracisternales, pero en la mayoría de los casos es una solución diluida de proteína, en la cual puede observarse material macromolecular (figura 25-5, B).

c) *Etapla del complejo de Golgi*. Después de pocos minutos, la proteína elaborada alcanza la zona del Golgi, probablemente por medio de continuidades con el retículo endo-

plásmico, que son permanentes o, con mayor probabilidad, transitorias. En esta región puede producirse un proceso en dos etapas. En la segunda de ellas, la proteína se concentra progresivamente, formando gránulos de procimógeno rodeados de una membrana del complejo de Golgi.

d) *Etapla del cimógeno*. Condensándose en forma paulatina, las enzimas emigran a la porción apical de la célula donde pueden liberarse por exocitosis, previa adherencia de la membrana superficial del gránulo con la membrana celular en la superficie de la luz glandular (fig. 25-10, 4 → 4).

e) *Etapla intraluminal*. Las enzimas se desplazan lentamente por la luz de los ácinos y los conductos, siendo diluidas luego por otras secreciones a su entrada en la cavidad intestinal.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Caro, L. G. et Palade, G. E.: (1961) Le rôle de l'appareil de Golgi dans le processus sécrétoire. Etude autoradiographique. *C. R. Soc. Biol.*, 155: 1750.
- De Robertis, E.: (1949) Cytological and cytochemical bases of thyroid function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 50:317.
- De Robertis, E. and Sabatini, D. D.: (1960) Submicroscopic analysis of the secretory process in the adrenal medulla. *Fed. Proc.*, 19:70.
- Gabe, M. and Arvy, L.: (1961) Gland cells. In: *The cell*, vol. 5, p. 1. (Brachet, J. and Mirsky, A. E., eds.) Academic Press, New York.
- Junqueira, L. C. and Hirsch, G. C.: (1956) Cell secretion: a study of pancreas and salivary glands. *Int. Rev. Cytol.*, 5:323.
- Kurosomi, K.: (1961) Electron microscopic analysis of the secretion mechanism. *Int. Rev. Cytol.*, 11:1.
- Palay, S. L.: (1958) The morphology of secretion. In: *Frontiers in Cytology*. (Palay, S. L., ed.) Yale University Press, New Haven.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Hirsch, G. C.: (1961) In: *Biological structure and function*, vol. 1, p. 195. (Goodwin, T. W. and Lindberg, O., eds.) Academic Press, New York.
2. Smith, R. E. and Farquar, M. G.: (1966) *J. Cell Biol.*, 31:319.
3. Zambrano, D.: (1969) *Z. Zellforsch.*, 93:560.
4. Junqueira, L. C. V.: (1967) In: *Secretory mechanisms of salivary glands*, p. 286. (Schneyer, L. H. and Schneyer, C. A., eds.) Academic Press, New York.
5. Junqueira, L. C. V. et al.: (1949) *J. cell. comp. Physiol.*, 34:129.
6. Hirsch, G. C.: (1955) Allgemeine Stoffwechselphysiologie des Cytoplasmas. *Hb. Allg. Pathol.*, Bd. 11.
7. De Robertis, E.: (1940) *Anat. Rec.*, 78:473.

8. De Robertis, E.: (1941) *Anat. Rec.*, 80:219.
9. Palay, S. L.: (1958) The morphology of secretion. In: *Frontiers in Cytology*. Yale University Press, New Haven.
10. De Robertis, E. and Vaz Ferreira, A.: (1957) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 3:611.
11. De Robertis, E. and Sabatini, D. D.: (1960) *Fed. Proc.*, 19:70.
12. De Robertis, E. and Bennett, H. S.: (1955) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1:47.
13. Douglas, W. W.: (1966) In: *Mechanisms of release of biogenic amines*, p. 267. (Von Euler, V. S., Rossel, S. and Uvnas, B.) Pergamon Press, Oxford.
14. Blaschko, H., Hagen, J. M. and Hagen, P.: (1957) *J. Physiol. (London)*, 139:316.
15. Smith, A. D.: (1968) *The interaction of drugs and subcellular components of animal cells*, p. 239. (Campbell, P. N., ed.) J. & A. Churchill Ltd., London.
16. Blascko, H., Smith, A. D., Winkler, H., Van den Bosch, H. and Van Deenen, L. L. M.: (1967) *Biochem. J.*, 103:30, C-32 C.
17. Hillarp, N. A.: (1959) *Acta physiol. scand.*, 47: 271.
18. Douglas, W. W. and Poisner, A. M.: (1966) *J. Physiol. (London)*, 183:236.
19. Banks, P.: (1966) *Biochem. J.*, 101:536.
20. (1967) *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, 31:94.
21. Schneider, F. H., Smith, A. D. and Winkler, H.: Caspersson, T., Landstrom-Hyden, H. and Aquilonius, L.: (1941) *Chromosoma*, 2:127.
22. Greene, L. J., Hirs, C. H. W. and Palade, G. E.: (1963) *J. biol. Chem.*, 238:2054.
23. Keller, P. J., Cohen, E. and Neurath, J.: (1958) *J. biol. Chem.*, 230:905.
24. Palade, G. E.: (1956) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2:417.
25. Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1958) *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4:203.
26. Caro, L. and Palade, G. E.: (1964) *J. Cell Biol.*, 20:473.
27. Palade, G. E.: (1959) In: *Subcellular particles*, p. 64 (Hayashi, T., ed.) The Ronald Press Co., New York.
28. Jamieson, J. D. and Palade, G. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:577.
29. Jamieson, J. D. and Palade, G. E.: (1967) *J. Cell Biol.*, 34:597.
30. Warshawsky, H., Leblond, C. P. and Droz, B.: (1963) *J. Cell Biol.*, 16:1.
31. Redman, C. M., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: (1966) *J. biol. Chem.*, 34:597.
32. Redman, C. M.: (1967) *J. biol. Chem.*, 242:761.
33. Redman, C. M. and Sabatini, D. D.: (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 56:608.
34. Sabatini, D. D., Tashiro, Y. and Palade, G. E.: (1966) *J. molec. Biol.*, 19:503.
35. Zambrano, D. and De Robertis, E.: (1967) *Z. Zellforsch.*, 76:458.
36. Jamieson, J. D. and Palade, G. E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:580.
37. Jamieson, J. D. and Palade, G. E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:589.
38. Schramm, M.: (1967) *Ann. Rev. Biochem.*, 36: 307.
39. Jamieson, J. D. and Palade, G. E.: (1968) *J. Cell Biol.*, 39:66a.

ÍNDICE ALFABÉTICO

A

- Aberraciones, autosómicas, 277
 - cromosomas sexuales, 279
 - cromosómicas, 253
 - especie humana, 277
 - por radiaciones, 261
- Absorción citofotométrica, 106
- Acetilcolina, localización, 449
 - sistema de la, 449
- Acetilgalactosamina, 129
- Acetilglucosamida, 47
- Acido(s), aminosulfónico, 100
 - cítrico, ciclo del, 69, 71
 - colorantes, 93
 - desoxirribonucleico, *véase* ADN
 - esteárico, constitución bipolar, 123
 - fenilpirúvico, 336
 - fosfórico, 51, 64
 - grasos, 50
 - constitución bipolar, 123
 - hialurónico, 47
 - neuramínico, 129
 - nucleicos, 50
 - colorantes, 93
 - componentes, 51
 - estructura, reacciones y papel en la célula, 50
 - técnicas citoquímicas, 100
 - pirúvico, 69
 - ribonucleico, *véase* ARN
 - siálico, 129
- Acoplamiento eléctrico, de las células, 368
 - y uniones estrechas, 142
- Actina, 420, 422
 - F, 422
 - G, 422
- Actividad mecánica, 397
- Actomiosina, 422
- Adaptación enzimática, 353
- Adenina, 52, 64
- Adenosina, 64
- Adenosindifosfato, 64
- Adenosinmonofosfato, 64
 - glucosa-1-fosfato, 122
- Adenosintrifosfato, 64
- Adhesión celular, 368
- ADN, bacteriano, 7
 - cambio hipercromático, 54, 55
 - cloroplastos, 216
 - conjugación, 335
 - contenido del núcleo, 306
 - y longitud de su molécula, 306
 - desnaturalización o fusión, 55
 - en el bacteriófago, 55
 - duplicación, 293
 - asincronismo, 308
 - ciclo vital de la célula y, 388
 - en eucariontes, 313
 - mecanismo molecular, 309
 - semiconservadora, 311
 - localización, 50
 - estructura, reacciones y papel en la célula, 50
 - mitocondrial, 192
 - modelo de Watson-Crik, 53
 - moléculas híbridas, 55
 - organización macromolecular, 290
 - polimerasa, 195, 305
 - protamina, 304
 - reacción de Feulgen, 100
 - redundante o repetido y amplificación genética, 360
 - renaturalización, 55
 - ribosómico, aislamiento de los cistrones, 327
 - amplificación de los cistrones, 328
 - ARN, transcripción, 332
 - organizador nucleolar y, 326
 - en ovocitos, demostración citoquímica, 331
 - síntesis, 296, 308
 - en la meiosis, 315
 - in vitro, 311
 - trasducción, 335
 - transformación, 335
- Adrenalina, secreción, 456
- Aerobiosis, 68
- Agentes químicos, acción citogénica, 264
- Agua celular, 39
 - libre, 39
 - ligada, 39
- Albinismo, 336
- Alcaptonuria, 336, 337
- Aldehídos, métodos basados en la demostración de, 100
- Alelos, 247
- Alisterasas, 103
- Almidón, 47
- Alociclia, 271
- Alopoliploidía, 259
- Alosomas, 268
- Amebas, 410
 - monopódicas, 410
 - polipódicas, 410
- Ameboidismo, 397
- Amilopectina, 47
- Amiloplastos, 203
- Amilosa, 47
- Aminas biógenas, 449
- Aminoácidos, 40
 - libres, 40
 - naturales, 40
- Aminoacil-trasfer-ARN, formación del complejo, 343
- Aminoplastos, 16
- Amitosis, 9
- Anabolismo, 57
- Anaerobiosis, 68
- Anafase, 23, 224
 - I, 242
 - II, 243
- Analizador, 80
- Anatomía, 3
- Anemia de células falciformes, 336
- Aneuploidía, 259
 - cáncer y, 281
 - complementos cromosómicos, 257
 - sexual en el hombre, 279
 - somática, 260
- Anfótero, 45
- Anillos de Balbiani y ADN, 363
- Anisótropo, 79
- Antibióticos, acción sobre la síntesis proteica, 351
- Anticodones, 342
- Anticuerpos marcados, 108, 110
- Antígenos, 108, 109
- Antimutágenos, 265

Aparato, de Golgi, *véase* Complejo de Golgi
 mitótico, 225
 aislamiento y estudios bioquímicos, 231
 cambios cíclicos en la birrefringencia, 229
 estudios con el microscopio electrónico, 231
 papel, 234
 ultraestructura, 228
 Apareamiento somático, 35
 Apoenzima, 59
 Arco reflejo, 428
 Arginina, métodos, 100
 ARN, bacteriano, 7
 células eucariontes, 316
 citoplásmico, heterogéneo, 317
 origen, 316
 estructura, 51, 55
 química de una cadena polinucleótida, 51
 reacciones y papel en la célula, 50
 localización, 50
 mensajero, 55, 316
 estable, 340
 heterogeneidad, 340
 poligénicos o policistronicos, 341
 síntesis, 341
 vida media, 340
 nucleoplásmico, 315
 heterogéneo, 316
 nucleolar, 297
 papel, 362
 en la regulación genética, 363
 ribosómico, 55, 316
 en el nucléolo, estadios en el procesamiento del, 328
 pasaje al citoplasma, 333
 pesos moleculares y longitudes de las moléculas extendidas, 329
 28, 18 y 5 S, 323
 tipos que intervienen en la síntesis proteica y en la transcripción genética, 316
 transferencia o soluble, 52, 55, 316, 342
 activadores, 363
 para la alanina, 343
 Asincronismo intracromosómico, 309
 Áster, 225
 Astrosfera, 225
 Átomos, densidad electrónica, 87
 tamaño en escala logarítmica, 4
 ATP, 64
 producción, 184
 número de moléculas que se originan en cada etapa oxidativa, 71
 ATPasa, membrana plasmática, 129
 en el transporte activo, 383
 ATP sintetasa, 178, 184

Atrofia muscular de Gowers, 274
 Autoagregación, principio de, 43
 Autofagia celular y lisosomas, 394
 Autofagosoma, 393
 Autofluorescencia, 107
 Autosomas, 268
 autocromo, 93
 Axón, 429
 Axoplasma, estructura, 432
 Azocolorantes, 103
 Azul, de metileno, 89
 tripano, 89

B

Bacterias, y mitocondrias, homologías, 195
 tamaño en escala logarítmica, 4, 5
 Bacteriófagos, organización macromolecular, 352
 recombinación, 352
 Balanza de tensión superficial, 123
 Baldwin, rueda de la energía de, 63, 64
 Banda, A, 416
 de cierre, 136
 I, 416
 Barr, corpúsculo de, 270
 Bases, colorantes, 93
 pirimídicas, 52
 proporciones molares, 52
 púricas, 52
 Bastones retinianos, 135
 estructura submicroscópica, 403
 fotomicrografías electrónicas del segmento externo, 137
 Behrens, método de, 97
 Bioenergética, 66
 Biología celular, citogenética, 9
 citoquímica, 10
 estado actual, 9
 fisiología celular, 10
 fuentes bibliográficas, 11
 historia y concepto, 2, 8
 introducción, 1, 2
 límites y dimensiones, 3
 molecular, 2, 5, 283
 niveles de organización, 2
 de la secreción, 453
 ultraestructura y biología molecular, 11
 unidades utilizadas, 6
 Birrefringencia, 79
 cristalina, 81
 fotoelástica, 81
 de forma, 81
 intrínseca, 81
 negativa, 80
 positiva, 80
 uniáxica, 80
 Blástula, 358
 Bouin, líquido de, 90
 Bouquet, 238
 Bromodesoxiuridina, 265
 Buzo cartesiano, 98

C

Cadena respiratoria, 68
 acoplamiento en la fosforilación, enzima, 184
 asimetría y localización ultraestructural del factor de acoplamiento y la, 184
 bacteriano, 7
 componentes, 183
 esquema, 67
 y mitocondrias, 183
 Cáncer, aneuploidía y, 281
 mutaciones por radiación, 263
 variación de los cromosomas, 260
 Capas, monomolecular, 123, 124
 de protección, 128
 Carboxidismutasa, 214
 Cariocinesis, 9
 Cariolinfa, 19
 Cariología, 219
 Carioplasma, 8
 Cariosomas, 19
 núcleo interfásico, 22
 Carioteca, 17
 célula viviente, 14
 núcleo interfásico, 22
 Cariotipo, 30
 humano, anomalías, 276
 normal, 275
 Carnoy, mezcla de, 90
 Carotenoides, 48, 208
 Carotenos, 48, 208
 Carrier, 383
 Catabolismo, 57
 Catalasa, 104
 Catecolaminas, secreción, 456
 Ceguera total para el color, 275
 Célula(s), 2
 ácidos nucleicos, reacciones y papel en la, 50
 adhesión, 368
 agua de la, 39
 aminoácidos libres, 40
 animal, ultraestructura, 18
 autotrófica, 63
 bacteriana, 6
 binucleadas, 22
 cancerosas, 368
 e inhibición de contacto, 369
 ciclo vital, 21
 componentes, inorgánicos, 38
 orgánicos, 38
 químicos, 38
 comunicación y acoplamiento eléctrico, 368
 descripción, 13
 diferenciación, *véase* Diferenciación celular
 disociación, 368
 estructura general, 13
 fijada, estructura general, 16
 forma, 13
 germinativas, 23, 235
 de los animales, 235
 mutaciones por radiación, 263
 de plantas fanerógamas, 236
 goniales, primarias, 235

- secundarias, 236
heterotróficas, 63
hidratos de carbono, 46
hijas, 23
interacción, 367
lípidos, 47
meristemáticas, 201
metabolismo, 63 (*véase también* Metabolismo celular)
métodos, de, estudio, 73
fraccionamiento, 97
musculares, 415
número, en un tejido, determinación, 365
en la vida embrionaria, 366
pancreática, secreción, 459
período de, división, 21
interfase, 21
población molecular, 38
polinucleadas, 22
polisacáridos complejos, 47
proteínas, 40
en el ciclo vital de la, 317
reasociación, 368
sales y iones, 39
somáticas, 235
mutaciones por radiación, 263
tamaño en escala logarítmica, 4, 5
troncales, 365
ultraestructura, 2
vegetal, 198
estructura general, 16
ultraestructura, 201
viviente, centrifugación, 16
estructura general, 14
estudio, 10
volumen, 14
Celulosa, 47, 144, 198
elementos estructurales, 200
Centrifugación, diferencial, 98
en gradientes, 98
isopícnica, 98
zonal, 98
Centríolos, 19, 225
células vivientes, 16
ciclo durante la mitosis, 226
y cuerpos basales, origen, 405
duplicación, 227, 406
hijos, 406
ultraestructura, 406
Centro celular, 19
en la mitosis, 225
Centrosoma, 225
Centrosoma, 225
Centríolos, 19, 225
células vivientes, 16
ciclo durante la mitosis, 226
y cuerpos basales, origen, 405
duplicación, 227, 406
hijos, 406
ultraestructura, 406
Centro celular, 19
en la mitosis, 225
Centrosoma, 225
Centrosoma, 225
Ceras, 48
cuticulares, 198
Cerebrósidos, 48
Ceroide, 109
Ciclo, del ácido cítrico, 69, 71
y mitocondrias, 182
de Embden-Meyerhof, 69
de la energía, 63
de Krebs, 69, 71, 182
ribosoma-polisoma, 347
factor de disociación, 347
tricarboxílico, 69, 71, 182
vital de las células, proteínas, 317
Ciclosis, 202, 397, 408
Cigonema, 241
Cigoto, 23, 221
Cilios, 19, 397
bioquímica, 400
de conexión, 404
derivados, 403
conos y bastones retinianos, 403
origen, 405
ultraestructura, 398
Cimógeno, 59, 459
Cinética enzimática, 60
activadores enzimáticos, 62
inhibición enzimática, 61
regulación de la actividad enzimática, 62
transformaciones alostéricas, 62
Cirros, 397
Cistrón, 353
Citocinesis, 225, 235
Citocromos, 68
grupo prostético, 59
Citocromoxidasa, 68, 104, 106
Citoesqueleto, 408
Citofotómetros, 106
Citogenética, 9, 245
bases celulares, 219
evolución y, 265
humana, 275
Citolisosoma, 182, 393
Citología, *véase* Biología celular
Citoplasma, 8, 148
basófilo, 148
célula viviente, 14
cromidial, 148
fundamental, célula fijada, 19
notas históricas, 148
pH y oxirreducción del, 152
potencial de oxirreducción, 152
primeros estudios submicroscópicos, 150
Citoquímica, 10, 95
dimensiones lineales y peso, relaciones entre, 6
enzimas, 102
inmunocitoquímica, 109
métodos de coloración, 99
proteínas, 99
radioautografía, 111
técnicas para los ácidos nucleicos, 100
Citosina, 52
Citosin trifosfato, 66
Clorofila, 208
Cloroplastos, 16, 19, 205
ADN, 216
composición química, 208
correlación entre la estructura y la función, 214
distribución, 208
división, 216
fotosíntesis, 212
herencia citoplásmica, 216
mitocondrias y, 203
morfología, 206
motilidad pasiva, 208
número, 206
organoides semiautónomos, 216
origen de la estructura lamelar, 211
origen simbiótico, 217
ribosomas, 217
síntesis de proteínas, 217
tamaño, 208
ultraestructura, 209
Coagulación sanguínea, 121
Cociente fósforo/oxígeno, 71
Código genético, 339, 344
degeneración, 344
Codón, 339
iniciador, 344
de terminación, 344
Coeficiente de sedimentación, 98
Coenzimas, 59
Colágeno, 41
ejemplo de unidad fibrosa, 119
esquema de la formación y reconstitución, 120
fibra de, 119
fibrillas, 120
interacción macromolecular, 119
Colchicina y mitosis, 264
Colesterol, 48
Colinacetilasa, 449
Colinesterasa, 103, 449
Coloidopexia, 384
Coloración(es), citológicas, 93
mecanismos de coloración, 83
métodos, citoquímicos, 99
histoquímicos, 99
negativa, técnica, 84
vital, 16
Colorantes, ácidos, 93
básicos, 93
electrónicos, 84
fluorescentes, 107
mecanismo de acción, 93
supravitales, 89
vitales, 89
Complejo, aminoacil-trasfer-ARN, formación, 343
de Golgi, 150, 166
aislamiento y estudios bioquímicos, 169
célula, vegetal, 202
viviente, 16
estudios citoquímicos, 168
papel en el transporte intracelular en la secreción pancreática, 464
secreción, celular, 167
de glucoproteínas, 170
de iniciación, papel de la subunidad 30 S en el, 347
del poro nuclear, 286
sinaptínico de los cromosomas meióticos, 296
de unión, 450
Comunicaciones intercelulares, 368
Concentración iónica, 376
Condrioferas, 182
Condroitinsulfato, 47

- Conducción del impulso nervioso**, 433
 intercililar, 401
 nerviosa, bases celulares, 428
 saltatoria, 437
Conductividad, 357
Congelación-desección, fijación, 92
Congelación-grabado, técnica, 84
Congelación-sustitución, fijación, 93
Conjugación del ADN, 335
Conos retinianos, 135
 estructura submicroscópica, 403
Constante de Michaelis, 61
Constricción céntrica o primaria, 222
Contracción, cambios macromoleculares en las miofibrillas, 418
 isocrónica, 401
 metacromática, 401
 muscular, 415
 energética, 423
 retículo sarcoplásmico, 424
 teoría del deslizamiento de los miofilamentos, 423
Contraste, métodos para intensificar el, 84
Coons, reacción de, 110
Corpúsculo de Barr, 270
 cromatínico, 270
Corriente citoplásmica, 397, 408
 microtúbulos, 409
Crestas mitocondriales, 175
Cretinismo bocioso, 336, 337
Crióstato, 93, 98
Cromátidas, 222
 acéntricas, 256
 dicéntricas, 256
 hermanas, 241
Cromatina, composición, 304
 núcleo interfásico, 22
 sexual, cromosomas sexuales, 270
 regulación, 270
 varones con múltiples corpúsculos de, 281
Cromocentros, 19, 32
 núcleo interfásico, 22
Cromóforos, 93
Cromogénicos, agentes, 99
Cromograninas, 458
Cromómeros, 33
Cromonema, 30
 ciclo de espiralización, 31
 cromómeros, 33
 intercromómeros, 33
Cromoplastos, 16, 206
Cromoproteínas, 41
Cromopexia, 384
Cromosomas, 9, 25
 accesorios, 268
 acrocéntricos, 25, 26
 aloploidia, 259
 alteración de los, 253
 aneuploidia, 259
 autosómicos, aberraciones, 277
 bacterianos, 7
 del bacteriófago, síntesis in vitro, 311
 bandas, 35
 cambio de la morfología por la colchicina, 26
 cariotipo humano normal, 275
 célula viviente, 14
 centrómero, 26
 ciclo vital de la célula, 21
 constantes morfológicas, 29
 constricciones secundarias, 27
 cromonema, 30
 deficiencia o delección, 253
 dobletes, 35
 duplicación, 254
 durante la síntesis del ADN, 293
 espirales, 30
 eucromatina, 32
 gigantes, 33
 plumulados, 33, 36
 politénicos, 33
 heterocromatina, 32
 hijos, 224
 homólogos, 23, 247
 interbandas, 35
 inversión, 256
 meióticos, complejo sinaptinémico, 296
 metacéntricos, 25, 26
 microfibrillas, 292
 monoploides, 258
 morfología, 25
 multivalentes, 258
 mutación, 253
 neo-XY, 272
 neo-Y, 273
 no disyunción, 260
 núcleo interfásico, 22
 nucleolares, 29
 número diploide en algunos vegetales y animales, 23, 29, 30
 poliploides, 258
 politénicos, control de la actividad genética, 363
 profásico, 222
 reducción somática, 260
 reduplicación, 260
 satélites, 29
 sexuales, 268
 aberraciones, 279
 cromatina sexual, 270
 heteropicnosis, 271
 mosaicos, 281
 vesícula sexual, 271
 somáticos de algunos vegetales y animales, características, 28
 submetacéntricos, 25, 26
 tamaño, 30
 telocéntricos, 25, 26
 telómeros, 29
 trasferencia o *shift*, 255
 traslocaciones, 255
 ultraestructura, 292
 modelo de la fibra plegada, 292
 variación en el, cáncer, 260
 número, 257
 somática, 260
 X, 268
 genes ligados al, 274
 e Y, genes localizados en segmentos cromosómicos homólogos de los, 275
 influencia de los, 281
 Y, 268
 genes ligados al, 275
Crossing-over, 25, 241, 250
 y recombinaciones en la *Neurospora*, 252
Cubiertas externas, 128
 de la membrana celular, 142
 microambiente de la célula, 144
 propiedades, de infiltración, 144
 inmunológicas, 144
 y pinocitosis, 385
Cuerpo(s) basales, 398
 origen, 405
 ultraestructura, 400
 esféricos, núcleo interfásico, 22
 intermediario, 229
 pericentriolares, 406
 polares, 236
 residuales, 393
 de RNP en ovillo, 288, 291
Cultivo de tejidos, 10, 89
Cutina, 198
- D
- Dalton**, 6
Daltonismo, 274
De Broglie, fórmula de, 82
Deficiencia cromosómica, 253
 intersticial, 254
 terminal, 254
Degeneración walleriana, 430
Delección cromosómica, 253
Dendritas, 429
Densidad de flotación, 98
Desadaptación enzimática, 353
Deshidrogenasas, 67
 actividad, 68
 citoquímica, 104
Desmosomas, 138, 139
 tabicados, 141
Desnaturalización del ADN, 55
Desoxirribonucleoproteínas, 290
Desoxirribosa, 47, 51
Detoxificación, 164
Determinación del sexo, 268
 equilibrio genético, 273
 sistema neo-XY, 272
Deutoplasma, 16
Diacinesis, 241
Diapédesis, 410
Diazonio, reacción del, 99
Dicroísmo, 81
Dictiosomas, 167, 202
Diferenciación celular, 357
 control, de la actividad nuclear en las primeras etapas del desarrollo, 359
 citoplásmico de la síntesis del ADN, 359

nuclear del citoplasma, 358
 división celular y, 365
 Difosfopiridinucleótico (DPN), 104
 Difracción de rayos X, 85
 Difusión, 376
 iónica, 377
 Dimensiones en biología celular, 3
 dimensiones, microscópicas, escala logarítmica, 4, 5
 lineales, pesos y citoquímica, relaciones, 6
 Diploide, 9
 Diplonema, 241
 Disacaridasa, membrana plasmática, 129
 Disacáridos, 47
 Disgenesia ovárica, 281
 Discos, H, 416
 de Hensen, 416
 Disociación celular, 368
 Dispersión de electrones, 82
 División, celular, 221
 agentes estimulantes, 265
 concepto, 23
 diferenciación celular y, 365
 directa, 9
 ecuacional, 24
 indirecta, 9
 meiótica, 23
 reduccional, 24
 Donnan, equilibrio, 377
 Down, síndrome de, 277
 Duplicación, del ADN, 308
 asincronismo, 308
 en eucariontes, 313
 mecanismo molecular, 309
 semiconservadora, 311
 de cromosomas, 254

E

Ectobiología, 369
 Ectoplasma, 14
 Ecuación de Nernst, 377
 Efectores, 428
 Elastina, 41
 Electroforesis, 46
 representación esquemática, 45
 Electrones, número, 87
 dispersión, 82
 Embden-Meyerhof, ciclo de, 69
 Endocitosis, 153, 383
 Endomitosis, 35, 260
 Endopoliploidia, 260
 Endoplasma, 16
 Energía, libre, 66
 solar, ciclo, 62, 63
 total, 66
 transformación, 63
 uniones de alta, 64
 Entalpia, 66
 Entrecruzamiento cromosómico, 250
 Entropía, 66
 Envoltura nuclear, 19, 285 (véase también Membrana nuclear)
 complejos del poro, 286

estructuras anulares, 286
 permeabilidad, 287
 poros nucleares, 285
 potenciales, 287
 Enzimas, 38, 57
 activa, 59
 activadores, 67
 alostéricas, 62
 amarillas, 68
 cinética, véase Cinética enzimática
 citoquímica, 102
 especificidad, 58
 absoluta, 58
 estereoquímica, 58
 relativa, 58
 factores que influyen sobre la actividad de las, 59
 activación, 59
 concentración del sustrato y de la enzima, 59
 pH, 59
 temperatura, 59
 inactiva, 59
 inducción, 353
 inhibición, véase Inhibición enzimática
 localización, 57
 mitocondrias, 183
 lisosomas, 388
 membrana plasmática, 129
 microsómicas, 160
 mitocondrias y, 182
 nomenclatura, 57
 nucleares, 305
 ramificante, 122
 reacciones en cadena, 58
 regulación de la actividad, 62
 represión, 354
 sitio activo, 59
 que une la cadena respiratoria y la fosforilación, 184
Epidermolisis bullosa, 275
 Equilibrio, Donnan, 377
 genético en la determinación sexual, 273
 Ergastoplasma, 148
 Escala logarítmica de las dimensiones microscópicas, 4, 5
Escherichia, coli, 6
 tamaño, 6, 7
 Esfingolípidos, 48
 clasificación, 49
 Esfingomielinas, 48
 Espectrogramas, 86
 Espermatídes, 236
 Espermatocitos, primarios, 236
 secundarios, 236, 243
 Espermatogénesis, esquema, 236
 Espermatogonias, 235
 Espermatozoides, 236
 Espermioagénesis, 236
 Espiral, paranémico, 30
 plectonémico, 30
 relacional, 30
 Espodografía, 106
 Espongina, 454
 Estearal, 102
 Esterasas, citoquímica, 103
 Estereocilios, 398

Esteroides, 48
 Esteroles, 48
 Estructura(s), elementales, 118
 extracelulares, 118
 fuerzas fisicoquímicas, 121
 funciones, 118
 mecánicas, 118
 propiedades enzimáticas, 118
 transmitir información genética, 118
 membranosas, 122
 subcelulares, 118
 supracelulares, 118
 general de la célula, fijada, 16
 viviente, 14
 vegetal, 14
 de las proteínas, 41
 cuaternaria, 43
 primaria, 41
 secundaria, 42
 terciaria, 43
 Eucariontes, 6, 148
 biogénesis de los ribosomas, 326
 duplicación del ADN, 313
 y procariontes, diferencias en la regulación genética, 362
 Eucromatina, 32
 Euploides, 257
 Evolución y citogenética, 265
 Examen, supravital, 89
 vital, 89
 Excitación intracilar, 401
 Excreción, 453
 Exocitosis, 383, 463
 secreción de catecolaminas en la glándula suprarrenal, 458

F

Factor de, acoplamiento y la cadena respiratoria, 183
 asimetría y localización ultraestructural, 184
 disociación, 347
 Fagocitosis, 383
 y lisosomas, 394
 Fagosoma, 392
Fast green, 94
 Fecundación, 23
Feed back, 63
 Fenilketonuria, 336
 Fenotipo, 247
 Fermentación, 68
 alcohólica, 68
 Ferredoxinas, 213
 Ferritina, 108, 110
 moléculas de, 122
 Feulgen, reacción de, 100
 Fibra(s), continuas, 224
 cromosómicas, 224
 interzonales, 224
 muscular estriada, 415, 416
 nerviosas, 429
 amielínicas, 431
 diámetro y velocidad de conducción, 431
 mielínicas, 431

- Fibrillas de RNP intercromatínicas, 288, 291
- Fibrina, 121
- Fibrinógeno, 121
- Fijación, 89, 90
- congelación-desección, 92
- congelación-sustitución, 93
- gradiente de, 91
- métodos, 16
- Fijadores, ácidos, 90
- agentes, 90
- permeabilidad, 91
- tetróxido de osmio, 91
- Filamentos intersinápticos, 444
- Filopodio, 410
- Filoquinona, 213
- Fisiología celular, 10, 373
- Flagelos, 19, 397
- bioquímica, 400
- ultraestructura, 398
- Flavinas, 49
- Flavoproteínas, 49, 68
- Flujo axónico, 431
- Fluoresceína, 108, 110
- Fluorescencia, natural, 107
- secundaria, 107
- Fluorocromos, 107
- Formalina, 90
- Fórmula de De Broglie, 82
- Fosfamidasa, 103
- Fosfatasa, alcalina, membrana alcalina, 129
- método de Gomori, 102
- citoquímica, 103
- Fosfátidos, 48
- clasificación, 49
- Fosfo-diesterasas, 103
- Fosfolípidos, 48
- fases líquido-cristalinas, 124
- hexagonal, 124
- lamelar, 124
- membrana plasmática, 129
- Fosfomonoesterasa, 103
- ácido, membrana plasmática, 129
- Fosfoproteínas nucleares, 305
- Fosforilación, fotosintética, 213
- oxidativa, 68, 71
- y fotosíntesis, diferencias, 212
- Fosforilasa, 122
- Fósforo/oxígeno, cociente, 71
- Fotodínesis, 409
- Fotofosforilación, 213
- Fotorreceptores, 135
- Fotosíntesis, 16, 63, 202
- cloroplastos, 212
- y fosforilación oxidativa, diferencias, 212
- reacciones en la, luz o fotoquímicas, 213
- oscuridad o termoquímicas, 213, 214
- Fototropismo, 428
- Fraccionamiento celular, métodos, 96, 97
- Fructosa, 47
- Fuerzas de van der Waal, 44, 45
- G**
- Galactosa, 47
- Galactosemia, 336
- Gametogénesis, 23
- Gametos, 23
- Gangliósidos, 48
- estructura molecular, 49
- membrana neuronal, 129
- Gap junction, 142
- Gastrulación, 358
- Gelación, 16
- Gemelos univitelinos, 268
- Genes, 9, 245
- acción sobre el metabolismo, 336
- determinantes, 339
- dominantes, 246
- estructura de las proteínas y, 336
- estructurales, 339, 353
- inducción y represión enzimáticas, 353
- ligados, 273
- al cromosoma X, 274
- Y, 275
- localizados en segmentos cromosómicos homólogos de los cromosomas X e Y, 275
- operadores, 354
- recesivos, 246
- regulación, de la acción, 353
- a nivel de la transcripción, 355
- reguladores, 354
- redundancia, 360
- represores, 354
- naturaleza, 355
- y síntesis proteica, 338
- ultraestructura, 351
- Genética, 10
- esquema de la transcripción y trasducción en la información, 342
- expresiones moleculares de la acción, 335
- molecular, 301, 335
- regulación, diferencias entre procariontes y eucariontes, 362
- tipos de ARN que intervienen en la transcripción, 316
- Genotipo, 247
- Geotropismo, 428
- Ginandromorfos, 273, 281
- Glándula suprarrenal, exocitosis y secreción de catecolaminas, 458
- Glicéridos, 47
- Glicerofosfátidos, 49
- Glicolípidos, 49
- Glóbulos polares, 25
- Globulina, 110
- Glucocálix, 134, 144
- en la mucosa gastrointestinal, 144
- Glucógeno, 47
- organización macromolecular, 121, 122
- representación molecular de una macromolécula, 46
- retículo endoplásmico agranular, 164
- síntesis, 122
- Glucolípidos, 48
- Glucólisis, aeróbica, 71
- anaerobia, 68
- Glucoproteínas, 41, 47
- secreción, complejo de Golgi, 170
- Glucosa, 47
- degradación, 68, 69
- 1- fosfato, adenosinmonofosfato, 122
- Glucosamina, 47
- Golgi, complejo de, véase Complejo de Golgi
- Golgiosomas, 202
- Gomori, método de, 102
- Gonocitos, 235
- Gowers, atrofia muscular de, 284
- Gradiente, de concentración, 377
- de densidad, centrifugación en, 98
- eléctrico, 377
- de fijación, 91
- Grana, 209
- Gránulo(s), de cimógeno, 459
- cromafín, 458
- intercisternales, 463
- de RNP, intercromatínicos, 288, 291
- pericromatínicos, 288, 291
- Grasas neutras, 47
- Grupo prostético, 41, 59
- Guanina, 52
- Guanosintrifosfato (GTP), 66
- H**
- Hale, reacción de, 129, 369
- Haploide, 9
- Haploidia, 258
- Hem, 41
- Hemidesmosomas, 141
- Hemofilia, 274
- Hemoglobina, diferencias químicas en la secuencia de aminoácidos, 388
- estructura cuaternaria, 43
- patológicas, 338, 339
- síntesis en los polirribosomas, 345, 346
- Hensen, disco de, 416
- Heparina, 47
- Herencia, citoplásmica, 192, 216
- intermedia, 247
- leyes, 245
- ligado al sexo, 273
- Hermafroditas, verdaderos, 281
- Heterocigotos, 247, 268
- Heterocromatina, 32
- núcleo interfásico, 22
- ultraestructura, 294
- Heterocromosomas, 268
- Heterofagosoma, 392
- Heterogamético, 268
- Heteropicnosis de los cromosomas sexuales, 271

- negativa, 32
positiva, 32
Heterotrasferencia, 358
Hexosa, 47
Hialoplasma, 148
Hialuronidasa, 47
Híbrido, 245
Hidratos de carbono, 46
 membrana plasmática, 129
Hidrolasas, 58
Hidrólisis, 213
Hidroxilamina, 265
Hill, reacción de, 213
Histogénesis, 358
Histonas, 304
 papel, 362
Histoquímica, 96
 métodos basados en determi-
 naciones físicas, 106
 de coloración, 99
 microincineración, 106
 microscopio de fluorescencia,
 107
 técnicas para lípidos, 102
Homocigoto, 247, 268
 dominante, 247
 recesivo, 247
Homogamético, 268
Holoenzima, 59
Homotrasferencia, 358
Huso, central, 222
 metafásico, 222
- I**
- Ictiosis, 274
 hystrix, 275
Idiograma, 30
Impulso nervioso, 420
 conducción, 433
 propagación, 436
Inclusión, en celoidina, 93
 y corte, 93
 en parafina, 93
Inclusiones, célula viviente, 16
Índice, centromérico, 26
 nucleoplásmico, 21, 22, 221
 de recombinación, 251
Inducción enzimática, 353
Informosomas, 342
Inhibición, de contacto y células
 cancerosas, 369
 enzimática, 60, 61
 competitiva, 60, 61
 no competitiva, 60, 61
Inmunocitoquímica, 109
Insulina, estructura primaria, 41
Interacción, celular, 367
 macromolecular, 121
Inter Cromómeros, 33
Interfase, 243
Internodo, 431
Inversión cromosómica, 256
 paracéntrica, 256
 pericéntrica, 256
Ionización, ácida, 93
 del agua, 213
 básica, 93
Irritabilidad, 357, 428
- Isomerasas, 58
Isocítrico-deshidrogenasa, 104
Isocromosomas, 257
Isoenzimas, 60
Isotrópico, 79
- J**
- Jugo nuclear, 19
 núcleo interfásico, 22
- K**
- Kleinschmidt, técnica de, 84
Klinefelter, síndrome de, 279,
 281
Krebs, ciclo de, 69, 71
 y mitocondrias, 182
- L**
- Láctico-deshidrogenasa, 104;
 105
Lactosa, 47
Láminas anulares, 160
Lecitina, 129
Leptoscopia, 124
Leptonema, 238
Leucoplastos, 16, 206
Levulosa, 47
Ley(es), de la herencia, 247
 de Mendel, 9
 de la recombinación indepen-
 diente, 247
 de la segregación, 245
 del volumen celular constante,
 14
Ligamiento, 249
Ligasas, 58
Lignina, 198
Límites en biología celular, 3
Línea, M, 416
 Z, 415
Linina, núcleo interfásico, 22
Linkage, 249
Linked, 273
Líquido, de Bouin, 90
 extracelular, 375
 intersticial, 375
 intracelular, 375
Lipasas, 103
Lípidos, 47
 en citología, 50
 compuestos conjugados, 48
 constitución bipolar, 123
 disposición tridimensional y ta-
 maño de algunos, 48
 enmascarados, 50
 esteroides, 48
 figurados, 50
 membrana plasmática, 129
 relación con las mitocondrias,
 180
 simples, 47
 síntesis en el retículo endoplás-
 mico agranular, 164
 sistemas hidrolípidicos, 124
 técnicas histoquímicas, 102
- de las monocapas, 122
Lipidosis, 393
Lipofucsina, 109
Lipoides, 48
Lipoproteínas, 41, 50
Lisosomas, 19, 383
 autofagia celular y, 394
 concepto de espacio exoplás-
 mico y el, 394
 estabilidad y contenido enzi-
 mático, 388
 fagocitosis, 394
 pinocitosis, 394
 polimorfismo, 389
 primario, 389
 formación, 168
 secundario, 392
Lobopodio, 410
Locus, 247
Luteína, 49
Luz ultravioleta, absorción, 106
 espectro, 107
- M**
- Macromoléculas, 40
Málico-deshidrogenasa, 104
Maltosa, 47
Mapas genéticos, 250
Materia viviente, la masa más pe-
 queña, 7
Matriz, citoplásmica, 19, 148
 célula vegetal, 201
 organización química, 152
 propiedades, físicoquímicas,
 151
 mecánicas, 151
 ultraestructura, 153
 fundamental, célula fijada, 19
 mitocondrial, 175
Médula suprarrenal, morfología
 submicroscópica de la secreción
 en la, 456
Meiosis, 235, 237
 concepto, 23
 no disyuntiva, 276
 primera división meiótica, 237
 profase, complejo sinaptinémico,
 296
 segunda división meiótica, 237,
 243
 síntesis de ADN, 315
Membrana(s), artificiales, 131
 basales, 19
 biológicas, 122
 disposición molecular de los
 lípidos y proteínas, 122
 celular, bacteriana, 7
 cubiertas externas, véase Cu-
 biertas externas de la
 membrana celular
 intergrana, 211
 limitante externa, 19
 mitocondriales, 176
 permeabilidad, 186
 separación y propiedades,
 185
 nuclear, 17 (véase también
 Envoltura nuclear)

- Membrana(s), celular (cont.)
 célula viviente, 14
 microscopia electrónica, 285
 núcleo interfásico, 22
 ondulantes, 397
 plasmática, 17, 128
 aislamiento, 128
 bacteriana, 7
 célula viviente, 128
 vegetal, 19
 composición química, 129
 diferenciaciones, 136, 138
 estructura molecular, 130
 microscopia electrónica, 132
 interpretación de la imagen, 134
 modelos basados en bicapas lipídicas, 131
 permeabilidad, 128
 relaciones intercelulares, 136, 138
 vaina de mielina, 134
 sinápticas, 444
 de las terminaciones nerviosas, 450
 receptores centrales, 450
 Meromiosina, 421
 liviana, 422
 pesada, 422
 Merotomía, 358
 Mesosomas, 196
 Metabolismo, 57
 celular, 63
 ciclo de la energía, 63
 transformación de la energía, 63
 errores por acción genética, 336
 Metacromasia, 94
 Metafase, 23, 222
 I, 241
 II, 243
 Metahembras, 279, 281
 Metilcitosina, 52
 Método(s) (*véase también Técnicas*)
 aldehídos, 100
 arginina, 100
 de Behrens, 97
 citofotométricos, 106
 de coloración citoquímicos e histoquímicos, 99
 de fijación, 16
 de fraccionamiento celular, 97
 de Gomori, 102
 grupos-SH, 99
 histoquímicos basados en detecciones físicas, 106
 inmunocitobiológicos, 108, 109
 intensificar el contraste, 84
 microcromatográfico, 98
 microelectroforético, 98
 microincineración, 106
 micromanométrico, 98
 Microcentro, 225
 Microcinematografía, 10
 Microcirugía, 10, 90
 Microcromatográfico, método, 98
 Microcuerpos, 295, 383
 Microelectroforético, 98
 Microespectrofotómetro, 106, 108
 Microfibrillas de celulosa, 198, 200
 Microincineración, 106
 Microinterferometría, 78
 Micromanométrico, método, 98
 Micropinocitosis, 386
 Microquímica, 97, 98
 Microrrespirómetro, 98
 Microscopio, electrónico, 5, 81
 comparación con el óptico, 82
 preparación del material biológico, 83
 de fase, 74
 de fluorescencia, 107
 de fondo oscuro, 79
 de interferencia, 78
 límite de resolución, 74
 óptico compuesto, 74, 75
 poder resolutivo, 74
 de polarización, 5, 79
 Microsomos, 160
 actividades enzimáticas, 160
 subfraccionamiento, 162
 Micrótomos, 84
 de congelación, 92, 93
 Microtúbulos, 202
 aparato mitótico, 231
 citoplásmicos, 407
 circulación y transporte, 408
 contracción y movilidad, 408
 corriente citoplásmica, 409
 diferenciación celular, 408
 función mecánica, 408
 Microvellosidades, 136, 138
 Michaelis, constante de, 61
 Mielina, figuras de, 124
 vaina de, 134
 Millon, reacción de, 99
 Mioblastos, 415
 Miofibrillas, 415
 cambios macromoleculares durante la contracción, 418
 organización macromolecular, 416
 otros tipos, 420
 Miofilamentos, 420
 Mioglobina, 420
 esquema de difracción de rayos X, 86
 modelo de la molécula, 85
 Miopía, 274
 Miosina, 420, 421
 Mitochondrias, 19, 172
 actividad enzimática, 185
 acumulación de cationes, 191
 proteínas y otras sustancias, 181
 ADN, 192
 biogénesis, 195
 cambios, de conformación, 187
 en el volumen y forma in vivo, 173
 cantidad, 175
 célula, vegetal, 202
 viviente, 14, 172
 cloroplastos y, 203
 contracción, 190
 degeneración, 182
 distribución, 175
 de las enzimas, 185
 estructura, 175
 forma, 174
 funciones, 182
 hinchazón, 190
 localización de los sistemas enzimáticos, 183
 morfología, 173
 organoides semiautónomos, 192
 orientación, 175
 origen procariótico, 195
 oxidaciones biológicas, 182
 permeabilidad de las membranas de la, 186
 propiedades y separación de las membranas, 185
 relación con los lípidos, 180
 sistemas enzimáticos, 182
 síntesis proteica y de ribosomas, 195
 tamaño, 174
 variaciones de la estructura, 178
 Mitoplasto, 185
 Mitosis, 9, 221
 acción del citoplasma, 360
 análisis, 222
 anastrales, 222
 astral, 222
 concepto, 23
 duración de las fases mitóticas, 225
 no disyuntiva, 276
 fases, 23
 núcleo, 298
 sustancias, que actúan en la, metafase, 265
 profase e interfase, 264
 inhibidoras, 264
 Mixomiosina, 411
 Modelo de Watson-Crick, 53
 Molécula, de colágeno, 119
 de fibrinógeno, 121
 lipídicas, 122
 de mioglobina, 85
 de proteínas, 119
 tamaño en escala logarítmica, 4, 5
 Monoaminooxidasa, 104
 Monocapas, técnica de las, 122
 Mongolismo, 277
 Monera, 6
 Monómero, 40
 Monosacáridos, 47
 Monosomía, 276, 277
 del 18, 279
 del 21, 278
 Morfología, ramas, 5
 submicroscópica, 5
 Movimiento, ameboide, 410
 mecanismos, 412
 celular, 397
 ciliar, 397
 fisiología, 401
 flagelar, 397
 muscular, 397, 415
 Mucina, 144

Mucopolisacáridos, 47
 ácidos, 47
 Mucoproteínas, 47
 Músculo, contracción, 423
 estriado, 415
 proteínas estructurales, 420
 relajación, 426
 Mutación, 253
 agentes susceptibles de producir, 265
 cistrón y, 253
 puntiforme, 338, 339
 por radiación, 261
 células, germinativas, 263
 somáticas y cáncer, 263
 Mutágenos, 339
 Mutón, 353

N

Nadi, de Ehrlich, reactivo de, 68
 reacción de, 104, 106
 reactivo de, 104
 Nernst, ecuación de, 377
 Neuraminidasa, 129
 Neuroblastos, 430
 Neurofibrillas, 431
 Neuronas, 428
 bipolares, 429
 monopolares, 429
 motora (eferente), 428
 multipolares, 429
 organización general, 429
 respuestas graduadas, 438
 sensorial (aférente), 428
 Neurotúbulos, 407
 acción de la colchicina, 407
 estructura, 433
 Nodos de Ranvier, 431
 Noradrenalina, 439
 secreción, 456
 Nucleoide bacteriano, 7
 Núcleo, 21
 ARN, 315
 célula viviente, 14
 constancia, 21
 contenido en ADN, 306
 longitud de su molécula, 306
 control del citoplasma, 358
 envoltura, 285
 enzimas, 305
 estudio citoquímico, 301
 forma, 21
 interfásico, cromatina, 22
 cromocentros, 22
 cromosomas, 22
 cuerpos esféricos, 22
 estructura general, 22
 jugo nuclear, 22
 linina, 22
 membrana nuclear, 22
 nucleoplasma, 22
 introducción general, 21
 número, 22
 permeabilidad, 285
 poros nucleares, 285
 posición, 22
 proteínas, 304
 tamaño, 21

ultraestructura, 287
 localización de las ribonucleoproteínas, 288
 Nucleohistonas, 304
 Nucléolos, 19, 297
 aislamiento, 297
 célula viviente, 14
 ciclo mitótico, 298
 citoquímica, 297
 correlación entre su estructura y la biogénesis ribosómica, 331
 estadios en el procesamiento del ARN ribosómico, 328
 falsos, 32
 núcleo interfásico, 22
 núcleo interfásico, 22
 ultraestructura, 297
 Nucleolonema, 297
 Nucleoplasma, 22
 Nucleoprotaminas, 304
 Nucleoproteínas, 41, 302
 Nucleósido, 51
 Nucleotidasa, membrana plasmática, 129
 Nucleótidos, 51

O

Onda, electromagnética, 3
 de excitación, 429
 Operón, 354
 Organelas celulares vegetales, 16
 Organizadores nucleolares, 29
 y ARN ribosómico, 326
 Organogénesis, 358
 Organoides celulares vegetales, 16
 Osmio, tetróxido de, 91
 Ovocitos, primarios, 236
 secundarios, 236, 243
 Ovogénesis, esquema, 236
 Ovogonias, 235, 236
 Ovotestis, 281
 Ovótidas, 236
 Óvulo, 236
 fecundado, 357
 Oxidación, 67
 Oxidasas, 67
 citoquímica, 104
 Oxirreductasas, 58

P

Palmital, 102
 Paquinema, 241
 Paramiosina, 420, 422
 Paraplasma, 16
 Paraplejía espasmódica, 275
 Pared celular, 128, 198
 bacteriana, 7
 crecimiento, 199, 200
 sustancias, 198, 199
 PAS, reacción del, 100, 101
 Pectina, 144, 198
 Películas monomoleculares, 122, 123
 Pentosas, 47, 51
 Pepsina, 58
 Pepsinógeno, activación, 59

Pericarion, 429
 función biosintética, 430
 Permeabilidad, 128
 celular, 375
 y transporte, activo, 377
 pasiva, 376
 Permeasa, sistema, 382
 vacuolar, 163
 Peroxidasa, 104
 Peroxisomas, 383, 394, 395
 Peso, dimensiones lineales y citoquímica, relaciones, 6
 molecular, unidad, 6
 Picrogramo, 6
 Pigmentos lipogénicos, 109
 Pinocitosis, 383, 384
 cubiertas externas y, 385
 lisosomas y, 394
 y transporte activo, 388
 Piridinnucleótido-deshidrogenasas, 104
 Pirimidina, 52
 Placa, ecuatorial, 23, 223
 mioneural, 415
 terminal, 400
 Plantas fanerógamas, ciclo vital, 236, 237
 Plasma germinativo, 9
 Plasmodesmos, 19, 200
 Plástidos, 16, 198, 205
 primitivos, 205
 Plastoquinona, 213
 Pleuroneumonía, tamaño de los microbios de la, 4, 8
 Población celular, clasificación, 366
 durante la vida embrionaria, 366
 estática, 366
 expansión, 367
 renovación, 365, 367
 Poder resolutorio, 74
 Polarizador, 80
 Polifenoloxidasa, 104
 Polímero, 40
 Poliploidia, 258
 Polirribosoma, 324
 bacteriano, 7
 síntesis proteica, 345
 Polisacáridos, 47
 complejos, 47
 neutros, 47
 Polisoma, véase Polirribosoma
 Polisomatia, 260
 Politenia, 260
 Polocitos, 236
 Porfirinas, 49
 Poros nucleares, 285
 Potencial(es), de acción, 428
 propagado, 438
 eléctricos de las membranas, 376
 excitatorios, 441
 generadores, 438
 de placa en miniatura, 448
 postsináptico, excitatorio, 441
 inhibitorio, 441
 propagado, 429
 de reposo, 429
 sináptico, 438, 439, 440

- Preleptonema, 237
 Presión osmótica y soluciones fisiológicas, 375
 Principio de autoagregación, 43
 Procariontes, 6, 148
 Procentríolos, 406
 Profase, 23, 222
 II, 243
 Prolongación caudal, 411
 Prometafase, 222
 I, 241
 Protaminas, 304
 Proteínas, 41
 cargas eléctricas, 45
 ciclo vital de la célula, 317
 citoquímica, 99
 clasificación según su estructura secundaria, 42
 coloración, 93
 intensidad, 93
 conformación molecular, 119
 conjugadas, 41
 desnaturalización, 43
 estructura, cuaternaria, 43
 genes y, 336
 primaria, 41
 secundaria, 42
 terciaria, 43
 globulares, 41
 estructura terciaria, 43
 no histónicas o ácidas, 304
 papel, 362
 interacciones macromoleculares, 121
 fuerzas fisicoquímicas, 121
 ionización, 93
 membrana plasmática, 129
 musculares, 420
 localización y desarrollo, 422
 nucleares, 304
 pesos moleculares, 41
 propiedades, 41
 tintóreas, 94
 punto isoelectrico, 46
 renaturalización, 43
 residuales, 304
 ribosómicas, 325
 síntesis, 330, 344
 sedentarias, 464
 síntesis, acción de los antibióticos, 351
 alargamiento de la cadena proteica, 349
 ciclo ribosoma-polisoma, 347
 cloroplastos, 217
 factores proteicos que intervienen, 349
 genes y, 338
 iniciación, 348
 mitocondrias, 195
 papel de la subunidad 50 S, y 60 S, 349, 350
 polirribosomas, 345
 terminación de la cadena, 350
 tipos de ARN que intervienen, 316
 tipos de uniones no covalentes, 43, 44
 uniones en las moléculas, *véase* Uniones en la molécula proteica
 Proteínas, 58
 Protoplasma, 8
 cantidades de los principales componentes, 38, 39
 Protoplástidos, 205
 Puente peptídico, 41
 Puff y ADN, 363
 Punto isoelectrico de las proteínas, 46
- ### Q
- Quanta, 212
 Quantasoma, 214
 Queratina, 41
 Quiasmas, 25, 241, 250
 e índice de recombinación, 251
 Quimiodinosis, 409
 Quimiosíntesis, 63
 Quimiostato, 265
 Quimiotactismo, 412
 Quimiotaxis, 412
 Quimiotropismo, 428
 Quimotripsina, 58
 Quinasas, 59
 Quinetina, 265
 Quinetocoro, 26
 Quinetosomas, 400
 origen, 405
 Quitina, 47, 144, 198
- ### R
- Racker, factor de acoplamiento, 184
 Radiaciones, aberraciones cromosómicas, 261
 efectos genéticos, 260
 Radioautografía, 111
 Radioisótopos, 111
 Raíces ciliares, 398
 ultraestructura, 400
 Ranvier, nodos de, 431
 Rayos X, difracción de, 85
 Reacción(es), biosintéticas, 66
 en cadena, 58
 de Coons, 110
 del diazonio, 99
 endergónicas, 57, 64, 67
 específicas en el análisis citofotométrico, 100
 exergónicas, 57, 64, 67
 de Feulgen, 100
 fotoquímicas, 213
 de Hale, 129, 369
 de Hill, 213
 en la luz, 213
 de Millon, 99
 de Nadi, 104, 106
 nuclear, 100
 en la oscuridad, 213, 214
 del PAS, 100, 101
 plasmal, 102
 termoquímicas, 213, 214
 Reactivo, diamminobencidina, 104
 Nadi, 104
 de Ehrlich, 68
 de Schiff, 100
 Reasociación celular, 368
 Receptores, 428
 centrales en las membranas de las terminaciones nerviosas, 450
 respuesta graduada, 438
 Recombinación, en bacteriófagos, 352
 índice de, 251
 Recón, 353
 Reducción, concepto, 67
 somática, 260
 Relajación muscular, 426
 Represión enzimática, 354
 Resonancia, 52
 Respiración aerobia, 63
 celular, 68
 aerobia, 68
 anaerobia, 68
 Respuesta, graduada, 438
 todo o nada, 436
 Retículo endoplásmico, 19, 155, 156
 agranular, 19, 156
 conducción intracelular de impulsos, 164
 funciones, 164
 granular, 19, 156
 membrana, 159
 sarcoplásmico, 415, 424
 papel de, 426
 subsináptico, 444
 Reticulopodios, 411
 Retina, histogénesis, 404
 Retineno, 48
 Retinitis pigmentaria, 275
 Retroalimentación, inhibición, 62
 Ribete en cepillo, 138
 Ribonucleasa, estructura primaria, 41, 42
 membrana plasmática, 129
 Ribosa, 47, 51, 64
 Ribosomas, 19
 armado, 330
 ARN ribosómico, 28, 18 y 5 S, 323
 bacterianos, 7
 biogénesis en eucariontes, 326
 estadios, 329, 330
 clases principales, 322
 cloroplastos, 217
 número y concentración, 320
 proteínas, 325
 reconstitución, 325
 síntesis, en las mitocondrias, 195
 proteica, 344
 subunidades, 322
 Ribulosa, 47
 Rojo, Congo, dicroísmo, 81
 neutro, 89
 Rotores zonales, 98
 corte, 99
- ### S
- Sacarosa, 47
 Sakaguchi, test, 100
 Sales y iones celulares, 39

Sangre, coagulación, 121
 Sarcolema, 415
 Sarcómero, 416
 Sarcoplasma, 415
 Sarcosomas, 415
 energética de la contracción, 423
 Satélites, 29
 Schiff, reactivo de, 100
 Secreción, biología celular, 453
 catecolaminas, 458
 célula cromafín, 458
 celular y el complejo de Golgi, 167
 ciclo de la, 454
 aspectos citológicos, 456
 métodos de estudio, 454
 cimogénica, 459
 continua, 454
 discontinua, 454
 endocrina o interna, 453
 exocrina o externa, 453
 médula suprarrenal, morfología submicroscópica, 456
 pancreática, 459
 aislamiento y significado de los gránulos de cimógeno, 459
 exocrina, pilocarpina, 454
 mecanismo de la síntesis proteica, 466
 papel del complejo de Golgi en el transporte intracelular, 464
 requerimientos metabólicos para el transporte y excreción, 464
 síntesis y migración de proteínas, 463
 ultraestructura, 463
 serosa, 459
 Sedimentación, coeficiente de, 98
 Segmentación celular, 235
 Segregación somática, 260
 Seudópodos, 410
 Sexo, determinación, 268
 herencia ligada al, 273
 Sinapsis, 428, 439
 axoaxónicas, 441
 axodendríticas, 441
 axosomáticas, 441
 complejo sinaptínémico, 296
 eléctricas, 444
 estructura de la región de la, 441
 excitatorias e inhibitorias, 441
 puntos activos, 443
 respuesta graduada, 438
 Síndrome, de Down, 277
 de Klinefelter, 279, 281
 de Turner, 279, 281
 XYY, 281
 Sintetasas, 58
 Sistema(s), lipoproteicos, composición, 125
 neo-XY, 272
 transportador de electrones, 183
 vacuolar, 19, 153

célula vegetal, 201
 flujo de membrana y circulación, 163
 funciones, 162
 morfología general, 155
 propiedades, enzimáticas, 163
 osmóticas, 162
 síntesis proteica y segregación de productos, 164
 Solación, 16
 Solución(es), fisiológicas y presión osmótica, 375
 hipertónica, 376
 hipotónica, 375, 376
 isotónica, 375
 Sombreado, técnica del, 84
 Suberina, 198
 Subunidades bacterianas, 7
 Succino-deshidrogenasa, 104
 Sulfátidos, 48
 Superhembras, 279, 281

T

Técnicas, citoquímicas, ácidos nucleicos, 100
 enzimas, 102
 coloración negativa, 84
 congelación-grabado, 84
 difracción de rayos X, 85
 histoquímicas, lípidos, 102
 de Kleinschmidt, 84
 de las monocapas, 122
 del sombreado, 84
 Tectinas, 129
 Tejido, cultivo de, 89
 Telodendron, 429
 Telofase, 23, 224
 I, 243
 II, 243
 Telofragma, 416
 Telómeros, 29
 Tensión superficial, balanza de, 123
 Teoría, celular, 8
 del circuito local, 436
 de la continuidad del plasma germinativo, 9
 cromosómica de la herencia, 9
 del cuerpo impulsor, 234
 del deslizamiento de los filamentos, 419, 423
 neuronal, 439
 de Wiener, 81
 Terminación nerviosa, 429
 aislamiento, 449
 aminérgica, 449
 no aminérgica, 449
 separación de las membranas, 450
 Terminalización, 241
 Termotropismo, 428
 Test de Sakaguchi, 100
 Tetrazolium, 104
 Tetróxido de osmio, 91
Tight junction, 142
 Tigmotropismo, 428
 Tilakoides, 211
 Timidina, 51

tritiada, 112
 Timina, 52
 Tionina, dicroísmo, 81
 Tirosinasa, 104
 Tirosinosis, 336, 337
 Tixotropismo, 16
 Tonofibrillas, 139
 Tonofilamentos, 139
 Transcripción genética, tipos de ARN que intervienen, 316
 Traducción del ADN, 335
 Traductor biológico, 438
 Trasferasas, 58
 Transferencia de cromosomas, 255
 Transformación del ADN, 335
 alostérica, 62
 Traslocación, cromosómica, 255
 trisomía por, 278
 Trasmisión sináptica, 439
 eléctrica, 440
 potenciales sinápticos, 440
 química, 439
 sinapsis excitatorias e inhibitorias, 440
 teoría neuronal, 439
 Trasmisor adrenérgico, 439
 Transportadores, 383
 sistema vacuolar, 163
 Transporte activo, 377
 de iones, mecanismo, 381
 y potencial de membrana, 379
 importancia de la ATPasas, 383
 penetración de moléculas más grandes, 382
 pinocitosis y, 388
 propiedades, 378
 sistema, de la permeasa, 382
 Trifosfopiridinnucleótido, 104
 Tripletes, 339
 Tripsina, 58
 Trisomía, 276
 monosomía, del 5 y, 279
 del par 18, 279
 del par 21, 277
 por traslocación, 278
 Trombina, 121
 Tropismo, 428
 Tropocolágeno, 119
 Tropomiosina, 420, 422
 A, 422
 Turner, síndrome de, 279, 281
 Tween, 103

U

Ultracentrífuga analítica, 98
 Ultraestructura, 5, 11
 de la célula, 2
 esquema general, 18
 Ultrafagocitosis, 384
 Ultramicroquímica, 97, 98
 Ultramicroscopía, 79
 Ultramicrotomía, 84
 Ultravioleta, absorción de la luz, 106
 Umbral de, activación, 436
 excitación, 428
 Unidad(es), celular, 86

Unidad(es) (eont.)
 elementales, 118
 bidimensionales, 118
 del colágeno, como ejemplo
 de unidad fibrosa, 19
 fibrosas, 118
 membranosas, 118
 tridimensionales, 118
 unidimensionales, 118
 fotosintética, 216
 de membrana, 132
 especializaciones, 133
 Uniones, de alta energía, 64
 estrechas, 142
 y acoplamiento eléctrico, 142
 herméticas, 142
 intermedias, 142
 en la molécula proteica, 45
 covalentes, 44, 45
 electrostáticas o iónicas, 44,
 45
 fuerzas de Van der Waal,
 44, 45
 de hidrógeno, 44, 45
 por interacción de cadenas
 laterales no polares, 44, 45
 químicas 44, 45
 tabicadas, 134

Uridintrifosfato, 66
 Uracilo, 52
 Uroide, 411

V

Vacuola(s), autofágica, 393
 condensantes, 459
 digestiva, 392
 Vaina de mielina, 134
 fotomicrografía electrónica, 136
 modelo molecular, 135
 Variación somática en el núme-
 ro de cromosomas, 260
 Venenos mitóticos, 264
 Verde, Jano, 89
 rápido, 94
 Vesícula(s), cubiertas, 134
 sexual, 271
 zonas cromática y nucleolar,
 272
 sinápticas, 443
 adrenérgicas, 445
 aminas biógenas, 449
 aislamiento, 449
 y unidades cuánticas en la
 transmisión, 445

Virus, 6
 oncogénicos, 369
 tamaño en escala logarítmica,
 4, 5
 Viscosidad de diversas células,
 152

W

Waal, fuerzas de van der, 44, 45
 Watson-Crik, modelo de, 53
 Wiener, teoría de, 81

X

Xantófilas, 49
Xeroderma pigmentosum, 275
 Xilosa, 198

Z

Zona(s), nucleolares, 29
 de separación, 411
Zonula adherens, 142
Zwitterion, 45, 93

